

**DIE ELEKTRONENSTRAHLMIKROANALYSE DER ELEKTROLYTE
IN BIOLOGISCHEM WEICHGEWEBE**

Dr. rer.nat. Klaus Gehring

1974

Aus dem Physiologischen Institut der Universität München

Direktoren: Prof.Dr.med. K. Kramer
Prof.Dr.med. K. Thureau

DIE ELEKTRONENSTRAHLMIKROANALYSE DER ELEKTROLYTE
IN BIOLOGISCHEM WEICHGEWEBE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Dr.rer.nat. Klaus Gehring

aus

München

1974



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter: Prof. K. Thureau

Mitberichterstatter: Prof. K. Kramer

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 7. 74

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	
I) Präparation des Gewebes	1
1. Schockfrieren	3
2. Die Herstellung von Kryoschnitten	3
II) Technik und Durchführung der Elektronen- strahlmikroanalyse	17
1. Wahl der Apparatur	17
2. Elektronenstrahlmikroanalyse an dünnen gefriergetrockneten Kryoschnitten	18
3. Elektronenstrahlmikroanalyse an massiven tiefgefrorenen Präparaten	28
4. Auswertung der Vielkanalspektren	33
5. Quantifizierung	
a) Quantifizierung an Dünnschnitten	41
b) Quantifizierung an massiven tief- gefrorenen Präparaten	56
III) Literatur zur Methode	57
1. Schockfrieren	57
2. Herstellung und Verwendung gefrier- getrockneter Kryoschnitte	58
3. Kombination eines Rastermikroskops mit naheem energiedispersivem Röntgenspek- trometer	60
4. Quantifizierung	60
IV) Ergebnisse an biologischen Geweben	61
V) Literaturverzeichnis	69

EINLEITUNG

Die Elektronenstrahlmikroanalyse wurde 1951 von Castaing (1) als Methode zum lokalisierten Nachweis von Elementen in Mikrovolumina eingeführt. Sie beruht darauf, daß beim Auftreffen eines hinreichend energiereichen, fein gebündelten Elektronenstrahls auf ein Präparat an der Beschußstelle elementcharakteristische Röntgenstrahlung entsteht, deren Analyse mit geeigneten Spektrometern Aufschluß über die Elementzusammensetzung an der Beschußstelle gibt.

Bei dieser Erzeugung charakteristischer Strahlung laufen zwei physikalische Prozesse ab. Ein einfallendes Elektron ionisiert ein Atom des Präparates, indem es aus einer der Schalen ein Elektron herausstößt. Anschließend rückt ein Elektron aus einer weiter außen liegenden Schale auf den leergewordenen Platz nach, und die Differenz der Bindungsenergien der beiden Schalen wird mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (Fluoreszenzausbeute) als Photon frei. Die Energien der Elektronen in den Schalen sind elementcharakteristisch, genauso ihre Differenzen, so daß das entstehende Photon eine elementcharakteristische Energie bzw. Wellenlänge hat.

Die räumliche Auflösung der Analyse hängt davon ab, wie fein der einfallende Elektronenstrahl gebündelt ist und wie tief er in das Präparat eindringt. Die Nachweisempfindlichkeit für ein bestimmtes Element hängt davon ab, wie viel von der erzeugten Strahlung mit dem Spektrometer erfaßt werden kann (Effizienz) und wie gut seine spektrale Auflösung ist.

In der Festkörperphysik, der Metallurgie und der Mineralogie wird die Elektronenstrahlmikroanalyse schon lange und erfolgreich angewandt. Für die Zellphysiologie ist eine lokale Elementanalyse prinzipiell von großer Bedeutung.

Die Elektronenstrahlmikroanalyse wird hier aber erst seit einigen Jahren (15, 17, 18, 19, 20, 24) eingesetzt und ist erst im Begriff, eine Routinemethode zu werden. Das hat im wesentlichen zwei Gründe:

1. Viele der in der Biologie interessierenden und mit der Elektronenstrahlmikroanalyse erfaßbaren Elemente ($Z \geq 11$) liegen zum großen Teil als Ionen in wässriger Phase vor, so daß die Herstellung von Präparaten, die in der Elementverteilung hinreichend genau den in vivo-Zustand wiedergeben, ein ernsthaftes Problem ist.
2. Biologische Präparate sind wegen ihrer relativ schlechten Wärmeleitfähigkeit weit weniger elektronenbelastbar als Festkörper. Deshalb ist bei tolerierbaren Strahlströmen die Röntgenemission so gering, daß erst die in den letzten Jahren entwickelten Halbleiterdetektoren eine ausreichende Zählausbeute liefern.

In der vorliegenden Arbeit werden für die Untersuchung von biologischem Material zwei Kombinationen von Präparations- und Analysetechniken angegeben:

Bei der einen Kombination werden gefriergetrocknete Kryoschnitte analysiert. Dieses Verfahren kann als Routinemethode betrachtet werden.

Bei der anderen Kombination wird die Oberfläche von tiefgefrorenen, polierten, massiven Präparaten auf einer speziellen Kühlbühne analysiert. Dieses Verfahren ist noch nicht zur Routinereife entwickelt worden.

I) Präparation des Gewebes

1. Schockfrieren

Als Methode für eine optimale Erhaltung der in vivo-Verteilung der Elemente bietet sich das Schockfrieren an. Dabei tritt das Problem auf, daß beim Eintauchen des Gewebes in die Gefrierlösung zwar die oberflächlichen Schichten sehr rasch eingefroren werden, aber wegen der schlechten Wärmeleitfähigkeit von Wasser und Eis die Kälte nur sehr langsam in die Tiefe vordringt, so daß sich dort Eiskristalle bilden. Die Eiskristallbildung ist abhängig von der Abkühlgeschwindigkeit. Deshalb entstehen in der Tiefe relativ große Kristalle, die nicht nur die Morphologie zerstören, sondern auch die Elementverteilung ändern. Die osmotisch wirksamen Bestandteile des Gewebes erstarren in einem eutektischen Gemisch um diese Kristalle herum, so daß eine Entmischung auftritt.

In oberflächlich gelegenen Partien des Präparates ist die Abkühlgeschwindigkeit so groß, daß die dort entstehenden Kristallite keine Lichtstreuung verursachen, d.h. sie sind kleiner als ca. 0.2μ . Betrachtet man in der Kammer des Gefriermikrotoms Kryoschnitte mit der Lupe, so erscheinen diese vitrifizierten Areale transparent. An einem gefriergetrockneten Kryoschnitt einer 20%igen Albuminlösung kann man diesen Effekt nachträglich im Elektronenmikroskop beobachten (s. Abb. 1): In einer Zone, die in diesem Fall $\sim 25 \mu$ tief reicht, war die Abkühlgeschwindigkeit groß genug, so daß die Lösung hinreichend homogen erstarrte (s. Ausschnitt links in Abb. 1). Weiter in der Tiefe dagegen entstanden größere Eiskristalle, die im getrockneten Schnitt Löcher hinterließen, während die getrocknete eutektische Lösung als

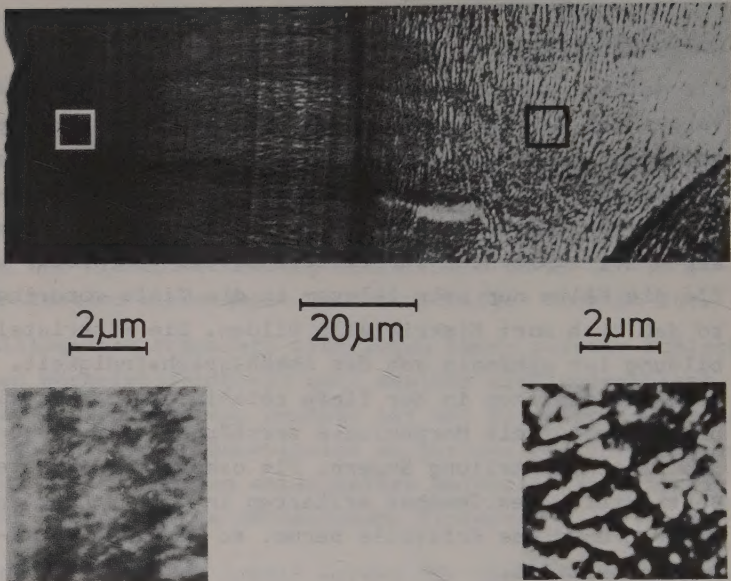


Abb. 1: Rastertransmissionsbild eines gefriergetrockneten, $1\ \mu$ dicken Kryoschnittes einer 20%igen Albuminlösung.

wabige Struktur erscheint (s. Ausschnitt rechts in Abb. 1). Will man also in der Tiefe des Gewebes vitrifizierete Bereiche erhalten, so muß man es vor dem Einbringen in die Gefrierlösung in geeigneter Weise zerkleinern. Zum raschen Einfrieren von tieferen Zonen der Niere läßt sich z.B. die in Abb. 2 gezeigte Vorrichtung verwenden. Die Niere des narkotisierten Versuchstiers wird in die Schale, die rechts am Schleuderarm befestigt ist, präpariert. Dabei bleiben Gefäße und Ureter erhal-

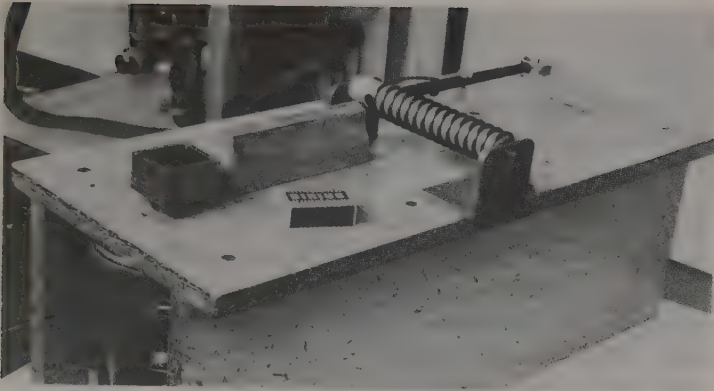


Abb. 2: Schleudervorrichtung zum Zerkleinern und sofortigen Schockfrieren der Rattenniere.

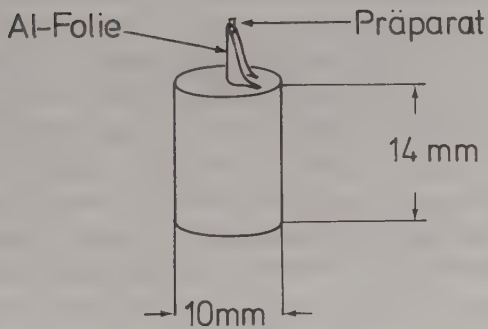


Abb. 3: Halter zum raschen Einfrieren kleiner Gewebestücke.

ten. Hält man ein Messer über den Abgang von Gefäßen und Ureter und löst den Haltebügel am Schleuderarm, so wird der Hilus abgeschnitten und die Niere über die Messer, die oben am Behälter für die Gefrierlösung befestigt sind, in diese hineingeschossen. So entstehen Scheiben, deren Oberflächen rasch eingefroren sind.

Kann zwischen dem Zerkleinern des Gewebes und dem Einfrieren etwas Zeit verstreichen, so läßt sich ein anderes Verfahren verwenden. Das Gewebstückchen wird dabei in die Spitze eines geeignet geformten Tütchens (s. Abb. 3) aus sehr dünner Aluminiumfolie geklemmt, das auf einem Messinghalter aufgeklebt ist. Der Raum im Tütchen, der nicht von dem Gewebe eingenommen ist, wird mit einer Albuminlösung bekannter Zusammensetzung angefüllt. Dauern diese Manipulationen länger, so daß mit einem Trocknen des Gewebes gerechnet werden muß, so können sie auch in einer feuchten Kammer durchgeführt werden. Anschließend werden Gewebstückchen und Albuminlösung in einer Kühlflüssigkeit eingefroren. Die Albuminlösung gibt dem Präparat die für das Schneiden nötige Festigkeit. Das Albumin, das zusammen mit dem Gewebe geschnitten wird, dient - wie später ausgeführt wird - als interner Standard für die Quantifizierung. Ist die Spitze des Tütchens hinreichend flach und spitz, so erlaubt das günstige Verhältnis von Oberfläche zu Volumen so große Abkühlgeschwindigkeiten, daß z.B. die gesamte Froschhaut, d.h. Epithel und Corium, vitrifiziert werden kann.

Als Gefrierlösung wurde in flüssigem Stickstoff gekühltes Propan verwendet. Es erwies sich am günstigsten, weil es eine höhere Verdampfungstemperatur hat als Stickstoff (-44.5° gegenüber -196° C), wodurch das Leyden-

frost-Phänomen reduziert wird und weil es bei tieferen Temperaturen erstarrt als Isopentan (-190° gegenüber -159° C), wodurch ein größerer Temperaturgradient erzielt werden kann.

Nach dem Schockfrieren ergeben sich für die weitere Präparation und für die Analyse zwei Wege. Entweder werden Kryoschnitte hergestellt, die nach der Gefrier-trocknung analysiert werden, oder das gefrorene Gewebe wird in die Mikrosonde eingebracht und seine Oberfläche im tiefgefrorenen Zustand analysiert. Hierbei empfiehlt es sich, im Kryotom eine plane Oberfläche herzustellen, weil die Unregelmäßigkeiten einer rauen Oberfläche die quantitative Analyse beeinträchtigen.

2. Die Herstellung von Kryoschnitten

Die Elektronenstrahlmikroanalyse an gefriergetrockneten Kryoschnitten erschien überschaubarer und technisch einfacher zu einer Routinemethode realisierbar zu sein, so daß zunächst dieser Weg vorgezogen wurde.

Es ist seit einiger Zeit bekannt, daß es möglich ist, dünne und sogar ultradünne Schnitte bei Temperaturen von -70° bis -90° C herzustellen (Appleton (2), Christensen (3), Hodkin und Marshall (4)). Aus den zitierten Arbeiten war aber zu ersehen, daß Schnitte, auf denen große Flächen gut erhalten sind, nicht nur viel Geduld, sondern auch einiges Glück erfordern. Für die Elektronenstrahlmikroanalyse war es primär wichtig, eine Schnitttechnik zu entwickeln, die es erlaubt, routinemäßig $1\text{ }\mu$ dicke Schnitte hinreichender Größe und Qualität herzustellen.

Dazu wurde das Ultramikrotom OMU 3 der Fa. Reichert mit dem Kühlzusatz FC 150 der Fa. Shandon verwendet. Der

Kühlzusatz erwies sich als nicht sehr zweckmäßig, da die Kühlung von Messer und Präparat mit einer Punktregelung erfolgte, d.h. wenn die Solltemperatur überschritten war, wurde ein Stickstoffventil geöffnet und kalter, gasförmiger Stickstoff in den Kühlbehälter von Messerhalter oder Präparathalter geblasen, bis die Solltemperatur erreicht war. Durch dieses stoßweise Kühlen konnten auch bei günstiger Wahl des Druckes im Stickstoffsystem Temperaturschwankungen von $\pm 1^{\circ}\text{C}$ nicht vermieden werden. Diese verursachten, daß Präparat und Messer gegeneinander drifteten. Dadurch wurde es praktisch unmöglich, Schnitte annähernd gleicher Dicke herzustellen.

Durch einen Umbau konnte diese Schwierigkeit mit geringem Aufwand umgangen werden (s. Abb. 4). Die Kühlbehälter von Messer und Präparat liegen jetzt nicht mehr direkt an Messer- und Präparathalter, sondern sind über geeignet dimensionierte Kupferbleche an diesen befestigt. Geregelt werden jetzt die Temperaturen an den Kühlbehältern mit den Regelschwankungen von $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Durch den Widerstand, den die Kupferbleche dem Kältefluß von den Kühlbehältern zu Präparat bzw. Messerhalter bieten, sind dort die Regelschwankungen praktisch weggedämpft.

Ein zweites Paar Termowiderstände an Präparat- und Messerhalter informiert über die dortige Temperatur. Man kann diese auf einen gewünschten Wert einstellen, indem man an den Kühlbehältern eine korrespondierende, empirisch ermittelte Solltemperatur vorgibt. Nach ca. 1/2 Stunde Einlaufzeit ist eine hinreichende Stabilität im System erreicht und die Temperaturen an Präparat- und Messerhalter sinken nur noch sehr langsam gegen einen asymptotischen Wert. Die jetzt noch ver-

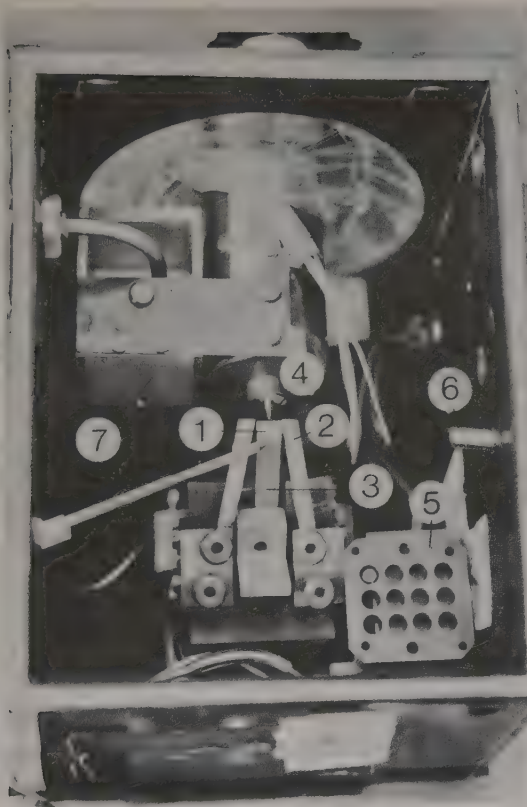


Abb. 4: Ansicht der Kryokammer des Gefriermikrotoms;

- 1 - Antirollplättchen
- 2 - Trimmstahl
- 3 - Stahlmesser
- 4 - Präparat
- 5 - mit Kollodiumfolie überspannte Messingplatte
zum Ablegen der Objektträgerblenden mit einer
abgelegten Blende
- 6 - Ende des Glasfiberstabs, der Messer und Prä-
parat beleuchtet
- 7 - Kühltrog für die Kühlung des Präparathalters.

bleibende Drift ist sehr klein im Vergleich zu dem Vorschub von Schnitt zu Schnitt und die Unsicherheit in der Schnittdicke ist im wesentlichen bedingt durch die Genauigkeit des mechanischen Vorschubs, die bei ca. 0.2 μm liegt. Gleichzeitig wurde bei dem Umbau die Wärmeisolation von Messerhalter und Kühlkammer gegen den Kreuzsupport und von Präparathalter gegen den Mikrotomarm verbessert. Der Präparathalter ist jetzt über 4 Stahlspitzen mit dem Mikrotomarm verbunden, der Messerhalter steht auf 3 Spitzen auf einer Stahlplatte am Boden der Kryokammer, die ihrerseits mit 4 Spitzen in die Backen des Kreuzsupports eingespannt ist.

Das schockgefrorene Präparat wird in einem Behälter mit kaltem Propan in die Kryokammer gebracht, dort aus dem Propan genommen und in den Präparathalter gespannt. Von großer Bedeutung für das Gelingen der Schnitte ist das Trimmen des Präparats. Dazu eignen sich zwei entsprechend zugeschliffene Drehstähle, die knapp links und rechts von der Messerschneide, diese etwas überragend, eingespannt sind (s. Abb. 4).

Sind zwei Flanken der Trimmpyramide hergestellt, so wird das Präparat von außen um 90° gedreht und es können die anderen beiden Flanken getrimmt werden. Der mittlere Querschnitt der Trimmpyramide war i.a. ein Quadrat von ca. 0.3 mm Kantenlänge. Beim Schneiden ist manchmal ein Antirollplättchen nützlich (Abb. 4). Dazu wurde ein ca. 1 mm breites Glasplättchen verwendet, das vorn flach zugeschliffen ist und mit einem Mikromanipulator an den Messerrücken herangebracht werden kann. Die Schneidegeschwindigkeit wurde sehr langsam gewählt (ca. 0.1 mm/sec), damit der entstehende Schnitt möglichst im Temperaturgleichgewicht mit der Messerschneide ist. Damit

sollte erreicht werden, daß in dem auf der Messerschneide entstehenden Schnitt keine im Vergleich zur Dicke nennenswerte Schmelzzone auftritt. Ihre Ursache könnte eine durch die hohen Schneidedrucke bedingte Gefrierpunktserniedrigung (maximal -30°C) und Reibungsentropie sein (2, 3). Die Schneidetemperaturen wurden gewöhnlich zwischen -75°C und -85°C eingestellt. In diesem Temperaturbereich tritt einmal während der Zeit, die fürs Schneiden nötig ist, keine Rekristallisation ein (22) und zum anderen sind die Eigenschaften des Präparats für das Gelingen der Schnitte noch günstig. Die Schnitte werden vom Messer mit einer Kollodiumfolie ($1000\text{ \AA}$) abgenommen, die eine elektronenmikroskopische Objektträgerblende überspannt. Zum Manipulieren der Objektträger eignet sich ein nach Appleton (2) modifiziertes magnetisches Werkzeug. Dieses ist ein etwa 13 cm langes Eisenstängchen (s. Abb. 5), auf das eine Spule gewickelt ist. Durch diese wird ein Wechselstrom geschickt, der das Stängchen magnetisiert, so daß man mit seiner Spitze elektronenmikroskopische Objektträger aus magnetisierbaren Metallen aufnehmen kann. Es wurden Nickelblenden von 3 mm Durchmesser verwendet, die einen Schlitz von $1 \times 2\text{ mm}$ haben.

Zum Ablegen der Objektträger genügt es nicht, den Strom abzuschalten, weil je nachdem, wann in der Phase des Wechselstroms der Moment des Abschaltens liegt, ein Restmagnetismus bleiben kann, der die Objektträger an der Spitze des Stängchens weiterhaften läßt. Es wurde daher die Magnetisierung des Stängchens reduziert, indem mit einem Widerstand, der mit einem Pedal betätigt werden kann, der Strom durch die Spule verringert wurde.

Nach der Schnittabnahme wird der Objektträger in der Kryokammer auf ein zweites Häutchen abgelegt, das Boh-

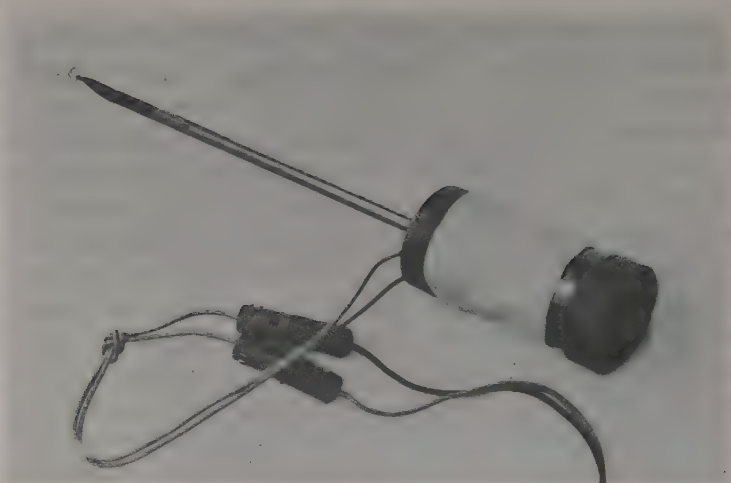


Abb. 5: Magnetische Vorrichtung zum Manipulieren der Nickelobjektträgerblenden.

rungen in einer Messingplatte (s. Abb. 4) überspannt. Der Schnitt liegt somit zwischen zwei Kollodiumhäutchen. Noch in der Kryokammer wird die Messingplatte mit den Blenden darauf in ein verschließbares Döschen gebracht, das zum Trocknen der Schnitte ins Hochvakuum gestellt wird. Nach dem Trocknen und Erwärmen auf Zimmertemperatur werden die Schnitte aus dem Vakuum genommen und mit einem Draht, der an der Spitze eines LötKolbens befestigt ist, werden die Nickelblenden aus der Kollodiumfolie, auf der sie liegen, herausgeschnitten.

Die Abb. 6, 7 und 8 zeigen Rastertransmissionsbilder von Schnitten der Froschhaut, die auf diese Weise ge-

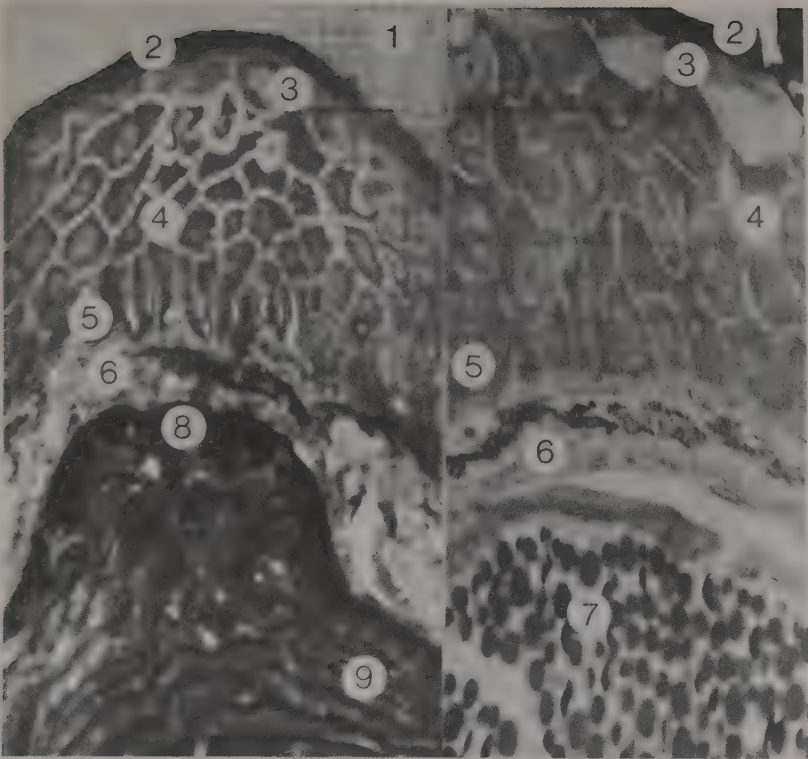


Abb. 6 und Abb. 7: Rastertransmissionsbilder von 1 μ dicken gefriergetrockneten Kryoschnitten der Froschhaut:

- 1 - 20%iges Albumin
- 2 - Stratum corneum
- 3 - Stratum granulosum
- 4 - Stratum spinosum
- 5 - Stratum germinativum (basale)
- 6 - lockeres Corium mit Melanin
- 7 - Blutgefäß im lockeren Corium
- 8 - Ca-Schicht
- 9 - Lederhaut

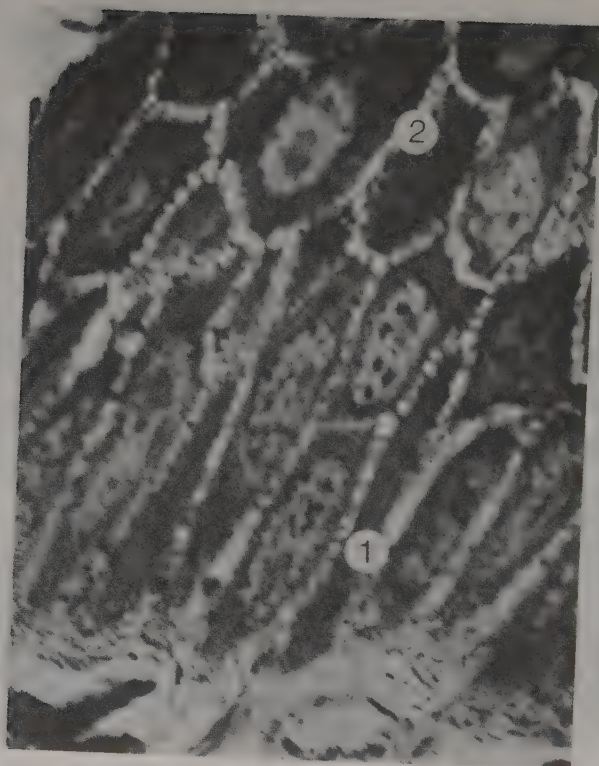


Abb. 8: $1/2\ \mu$ dicker, gefriergetrockneter Kryoschnitt
der Froschhaut:

1 - Stratum germinativum

2 - Stratum spinosum

wonnen wurden. Im Gegensatz zu den in Abb. 6 und Abb. 7 dargestellten Schnitten, die mit Stahlmessern 1 μm dick hergestellt wurden, wurde der Schnitt in Abb. 8 mit einem Glasmesser 1/2 μm dick geschnitten. Die Kontraste sind allein durch die unterschiedliche Dichte der Trockensubstanz bedingt. In Abb. 6 sind deutlich die Spuren von Unregelmäßigkeiten in der Schneide des verwendeten Stahlmessers zu sehen. Das Schneiden mit Glasmessern erfordert etwas mehr Geduld, weil vermutlich durch elektrische Phänomene am Glasmesser relativ fest hängende Gewebsfragmente die Qualität der nachfolgenden Schnitte beeinträchtigen.

Eine Frage, die man sich bei der Verwendung von gefriergetrockneten Kryoschnitten stellen muß, lautet: Wohin kommen während der Gefriertrocknung die in der Gewebsflüssigkeit gelösten Elemente? Sehr naheliegend ist die Annahme, daß sie sich durch Adsorptionskräfte an den nächstliegenden Strukturen niederschlagen. Das bedeutet, daß für Gewebeteile, in denen die Trockensubstanz relativ homogen verteilt ist, die Elementverteilung in den gefriergetrockneten Schnitten den in vivo-Zustand gut wiedergeben.

Ein Beispiel für eine drastische Umverteilung ist das Lumen des Nierentubulus (Abb. 9). Die Elektrolyte, die in vivo in der Tubulusflüssigkeit über den Tubulusquerschnitt verteilt waren, werden nach dem Gefriertrocknen in den Bürstensäumen in einer grobkristallinen Form wiedergefunden, die eine quantitative Analyse praktisch unmöglich macht ($\rightarrow$ in Abb. 9). Zur Analyse des Tubuluslumens scheinen also nur tiefgefrorene, nicht getrocknete Präparate geeignet zu sein.

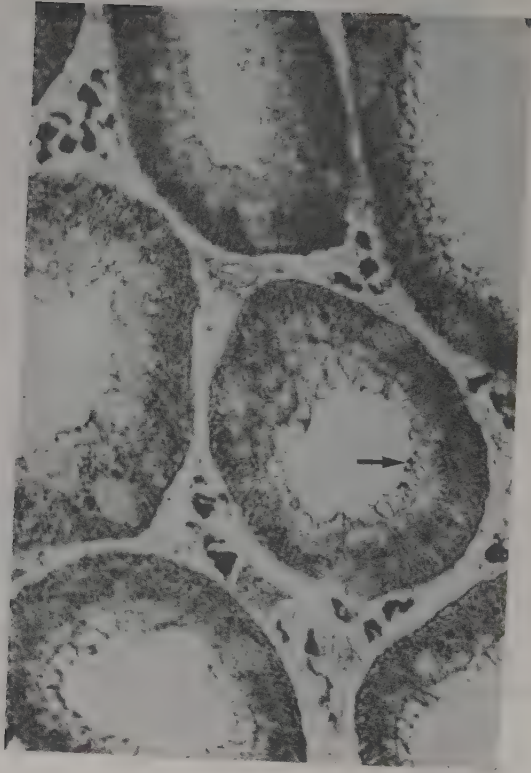


Abb. 9: 2 μ dicker gefriergetrockneter Kyrösnchnitt der Rinde der Rattenniere.

→ im Bürstensaum liegende Kristallite aus den Elektrolyten des Tubuluslumens.

II) Technik und Durchführung der Elektronenstrahlmikro-analyse

1. Wahl der Apparatur

Es gibt zwei Prinzipien, Röntgenstrahlen einer bestimmten Energie bzw. Wellenlänge nachzuweisen.

Beim wellenlängendispersiven System fällt die von der Beschußstelle im Präparat ausgesandte Strahlung auf einen Kristall bekannter Gitterkonstante. Durch geeignete Neigung des Kristalls erreicht man, daß in eine bestimmte Richtung nur diejenige Röntgenstrahlung gestreut wird, die der Bragg-Bedingung genügt, also Strahlung einer definierten Wellenlänge. Die in diese Richtung fallenden Photonen werden mit einem Durchflußzählrohr gezählt.

Beim energiedispersiven System fällt die Strahlung auf einen Halbleiter, an dem eine Spannung anliegt. Je nach ihrer Energie erzeugen die einfallenden Photonen in dem Halbleiter verschieden hohe Impulse, die, nach geeigneter Verstärkung, geordnet nach ihrer Größe in einem Vielkanalanalysator gezählt werden.

Auf Grund der geometrischen Anordnung, die die Realisation der Bragg-Bedingung erfordert, zählt das wellenlängendispersive System 0.1% der emittierten Strahlung einer Wellenlänge, während ein nahe ans Präparat gebrachter Halbleiter 1% erfaßt. Z.B. zählt bei einem typischen, hier verwendeten Präparat ($[Na] = 100 \text{ meq/kg}$ Feuchtgewicht) während einer Meßzeit von 400 sec bei dem vertretbaren Strahlstrom von $5 \cdot 10^{-10} \text{ A}$ das energiedispersive System 800 Impulse der Natriumstrahlung, wogegen ein wellenlängendispersives nur 8 Impulse liefern würde, was für eine vernünftige Statistik zu wenig ist.

Der Vorteil des wellenlängendispersiven Systems, eine bessere Auflösung zu haben, kommt deswegen gar nicht zum Tragen.

Ein weiterer Vorteil des energiedispersiven Systems ist, daß ein Vielkanalspektrum gleichzeitig sowohl die charakteristischen Impulse der im gewählten Energiebereich liegenden Elemente als auch die weiße Strahlung (Bremsstrahlung) liefert, die - wie später ausgeführt wird - ein Maß für die Masse in dem vom Elektronenstrahl angeregten Volumen ist. Diese Information ist für die Quantifizierung erforderlich.

In den letzten Jahren wurde kommerziell ein energiedispersives System verfügbar, dessen Auflösung für die Analyse der hier interessierenden Elemente (Na bis Ca) gut genug ist (165 eV bei 6.5 KeV), dessen Halbleiter bis auf 10 mm ans Präparat gebracht werden kann und dessen Berylliumfenster, das die Vakuumsysteme von Probenkammer und Halbleiterdetektor trennt, für die Natriumstrahlung eine gute Transmission (50%) hat (Fa. Edax).

Nachdem eine möglichst gute Auflösung sowohl der Analyse als auch der Morphologie erstrebenswert ist, ist eine Elektronenoptik erforderlich, die einen sehr fein gebündelten Elektronenstrahl liefern kann. Von den verfügbaren Geräten schien das Rastermikroskop S4 der Fa. Cambridge geeignet, das den Elektronenstrahl auf einen Durchmesser von 150 Å bündeln kann.

2. Die Elektronenstrahlmikroanalyse an dünnen gefriergetrockneten Kryoschnitten

Zur Messung an den Schnitten wurde die in Abb. 10 dargestellte spezielle Probenbühne entwickelt und eingesetzt. Die Nickelblenden mit den Schnitten liegen auf

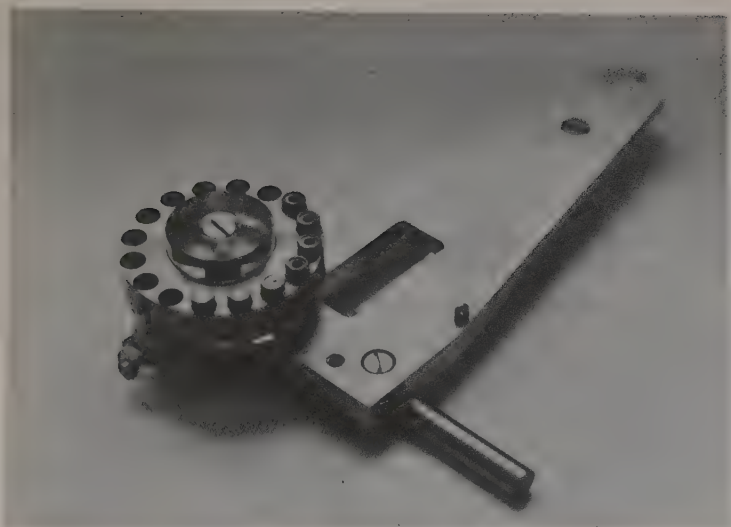


Abb. 10: Probenbühne zur Elektronenstrahlmikroanalyse
an Dünnschnitten.

Kohleröhrchen. Diese stecken in einer elektrisch isoliert auf der Bühne montierten Messingtrommel. Von außerhalb der Probenkammer kann jedes Röhrchen in Meßposition gedreht werden. Unter dem Röhrchen in Meßposition befindet sich der Detektor für die transmittierten Elektronen, die das Signal zur Erzeugung des Rastertransmissionsbildes liefern. In eine der Bohrungen der Messingtrommel kann ein Faradayzylinder gesteckt werden, mit dem über einen Schleifkontakt der Strahlstrom gemessen werden kann. Diese Anordnung erlaubt es, den Rüssel, in dem der Halbleiterdetektor untergebracht

ist, extrem nahe an die optische Achse des Mikroskops zu bringen (s. Abb. 11 und 12). Durch geeignete Einstellung der Höhe des Präparates kann der Abnahmewinkel relativ groß gehalten werden (s. Abb. 12), wodurch der Anteil der weißen Strahlung, die ins Spektrometer gelangt, reduziert wird. Im Gegensatz zur charakteristischen Strahlung wird diese nämlich nicht isotrop ausgesandt, sondern bevorzugt in Vorwärtsrichtung (5). Für reproduzierbare Messungen zwingt diese Tatsache dazu, immer dieselbe Zählgeometrie zu verwenden. Im Gegensatz zu Messungen an massiven Präparaten ist eine Neigung der Präparatoberfläche zum Detektor hin nicht notwendig, weil bei dünnen Schnitten die Reabsorption der Strahlung im Präparat vernachlässigt werden kann. Für Routineanalysen wurden hinreichende Zählraten mit einem Strahlstrom von $5 \cdot 10^{-10}$ A und einer Beschleunigungsspannung der Beschüßelektronen von 15 KV erzielt. Wie weiter unten ausgeführt wird, ist die richtige Wahl der Beschleunigungsspannung für die quantitative Analyse wichtig.

Von großer Bedeutung ist die Klärung der Frage, wie weit sich bei diesen Meßbedingungen das Präparat unter dem Elektronenbeschüß während der Analyse verändert. Die hierfür entscheidende Größe ist die Strömbelastung, das ist die Strahlstromdichte auf dem Präparat. Diese läßt sich sehr rasch variieren, indem man bei gleichem Strahlstrom von einem großen auf ein kleines Rasterfeld umschaltet. Wird auf einem homogenen Schnitt die Strombelastung variiert, so liefert die gleichzeitige Registrierung der Röntgenemission Information über Änderungen in Menge und Elementzusammensetzung an der Beschüßstelle. Abb. 13 zeigt den Verlauf der gesamten Zählrate

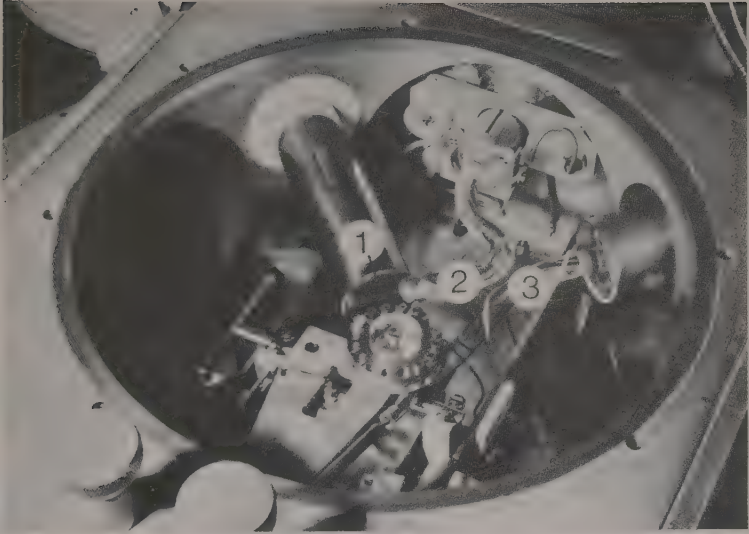


Abb. 11: Ansicht der Probenkammer des Rastermikroskops
von seitlich oben bei abgebauter Säule:

- 1 - Berylliumfenster des Röntgenspektrometers
- 2 - Lichtleiter mit Szintillationskristall
für die rückgestreuten Elektronen
- 3 - Lichtleiter für die Szintillationsimpulse
der transmittierten Elektronen

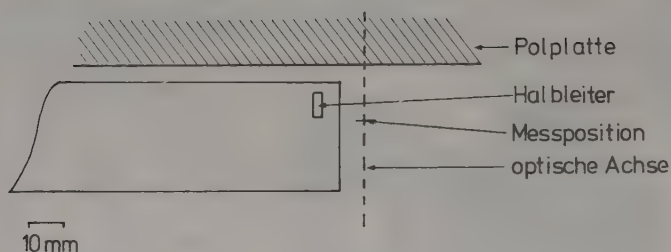


Abb. 12: Die Position des Halbleiterkristalls des Röntgenspektrometers in der Probenkammer.

von Versuchen, bei denen das Rasterfeld von $2500 \mu^2$ auf $1 \mu^2$ verkleinert wurde ($\downarrow$ in Abb. 13). Bei Kurve A wurden Schnitte, die zwischen zwei Kollodiumhäutchen liegen, analysiert; bei Kurve B lagen die Schnitte offen auf einer Kollodiumfolie und bei Kurve C wurde nur auf der Kollodiumdoppelfolie gemessen. In allen drei Fällen tritt sofort, nachdem die höhere Strombelastung einsetzt, ein Elementverlust auf, der anhält, bis sich das Präparat nach einer Dosis von ca. 30 nano Cb/ μ^2 stabilisiert hat. Um zu klären, welche Elemente dem Präparat verlorengehen, wurde auf einem Schnitt einer Albuminstandardlösung für 400 sec einmal ein großes ($2500 \mu^2$) und dann ein kleines ($1 \mu^2$) Rasterfeld analysiert. In beiden Fällen war der Strahlstrom 0.5 nA. Die dabei gemessenen Vielkanalspektren sind in Abb. 14 dargestellt. Die Linien sind in beiden Fällen gleich hoch, während

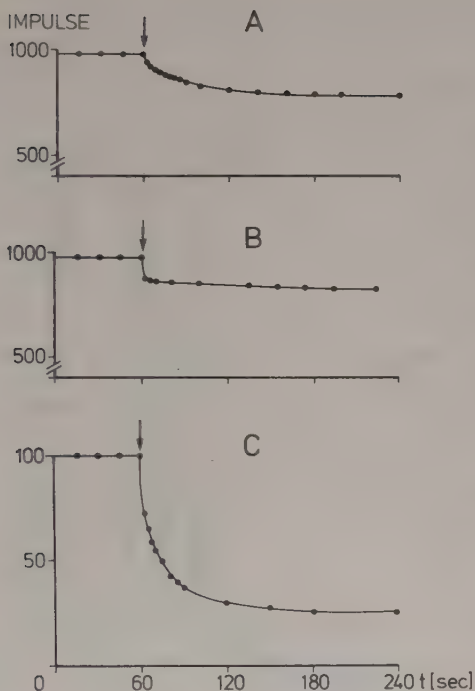


Abb. 13: Der zeitliche Verlauf der gesamten Zählrate bei Erhöhung der Strombelastung (Einzelheiten s. Text).

die Messung mit höherer Strombelastung (kleines Rasterfeld) einen kleineren Untergrund liefert. Das Präparat verliert somit nur Elemente der Matrix (H, C, N, O). Das Ergebnis von quantitativen Untersuchungen des Mas-

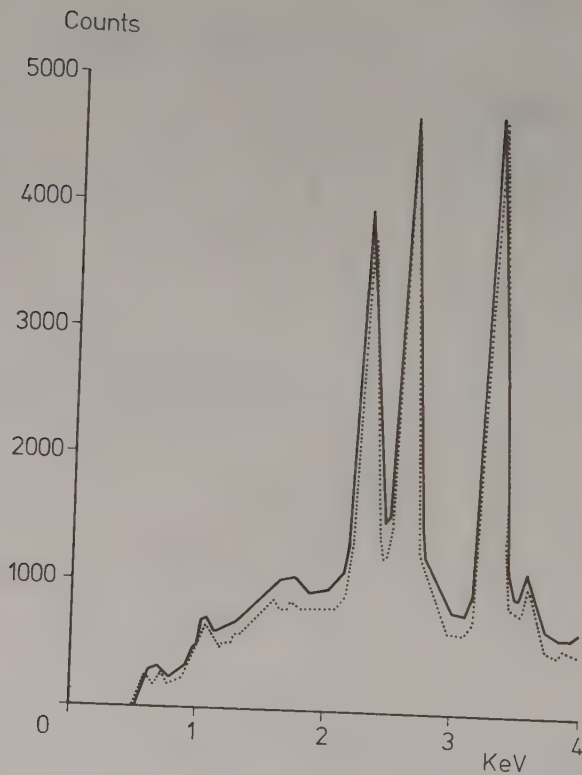


Abb. 14: Vielkanalspektren bei hoher (Punkte) und bei niedriger (ausgezogene Linie) Strombelastung desselben Dünnschnitts.

Tabelle 1: Zählratenverlust von bedeckten und unbedeckten Albuminschnitten

	Zählrate [cps]		Änderung [cps]	prozentua- ler Abfall
	kleine Strahlstromdichte	große		
Albumin- schnitt zwischen 2 Folien	1041 $\pm$ 97	849 $\pm$ 84	192 $\pm$ 30	18.6 $\pm$ 2.4
Doppel- folie	106.7 $\pm$ 7	25.7 $\pm$ 3	81 $\pm$ 6	75.9 $\pm$ 2.8
Albumin- schnitt	934 $\pm$ 97	823 $\pm$ 84	81 $\pm$ 31	11.86 $\pm$ 2.81
Albumin- schnitt offen auf 1 Folie	1113 $\pm$ 84	902 $\pm$ 54	211 $\pm$ 34	18.94 $\pm$ 1.8
Einfach- folie	55.2 $\pm$ 4	140 $\pm$ 1.3	41.2 $\pm$ 5	75.1 $\pm$ 1.8
Albumin- schnitt	1058 $\pm$ 8.3	888 $\pm$ 70	170 $\pm$ 23	16.4 $\pm$ 2.12

severluster ist in Tabelle 1 dargestellt. Untersucht wurden offen auf einer Folie liegende und von 2 Folien bedeckte Schnitte. Um den für das Präparat relevanten Zählratenverlust zu erhalten, wurde vom gesamten Zählratenverlust derjenige der Einfach- bzw. Doppelfolie abgezogen. Ein zwischen 2 Folien liegender Schnitt weist

einen Zählratenverlust von 12% auf und ein offen auf einer Folie liegender Schnitt einen von 16 - 17%. Nach den Ausführungen in Kapitel 5 ist das gleichbedeutend mit einem Masseverlust von etwa 12% bzw. 16% an Elementen der Matrix. Da für die Quantifizierung auch der hauptsächlich durch die Matrix bedingte Untergrund benötigt wird, muß man als Eichstandards Substanzen wählen, deren Zusammensetzung der des Gewebes ähnlich ist, so daß in den Eichmessungen möglichst dieselben Verhältnisse vorliegen, wie in den Messungen am Gewebe. Als Standards haben sich 20 - 40%ige Albuminlösungen bewährt, denen NaCl und KH_2PO_4 in solchen Mengen beige-mischt wurden, daß die resultierenden Konzentrationen denen des Gewebes etwa entsprachen. Diese Eichlösungen wurden wie das zu untersuchende Gewebe präpariert.

Hall et al. (persönliche Mitteilungen) berichten, daß eine Tiefkühlung der Präparate während der Analyse den Masseverlust praktisch völlig verhindert, so daß dieser keine prinzipielle Einschränkung der Methode bedeutet.

Die örtliche Röntgenauflösung der Analyse wird durch die Größe des angeregten Volumens bestimmt, das bei dünnen Schnitten ein Kegel ist (s. Abb. 25). Seine Basis hat einen Durchmesser, der etwa der Schnittdicke entspricht. Nach Hall (7) ist für 1 μ dicke Schnitte der Dichte $\rho = 1/3 \text{ g/cm}^3$ eine Auflösung von ca. 0.6 μ zu erwarten. Da die Analyse Aufschluß über den in vivo-Zustand des Gewebes geben soll, interessiert, wie scharf ein natürlich vorgegebener Konzentrationsgradient aufgelöst werden kann. Das bedeutet, daß man bestimmen muß, wie weit eine in vivo-Verteilung durch die Präparation verfälscht und durch die Analyse ungenau aufgelöst wird. Zu diesem Zweck wurden gefriergetrocknete 2 μ dicke Kry-

schnitte einer 30%igen kaliumfreien Albuminlösung, die im Verhältnis 3 : 1 mit Humanvollblut gemischt war, hergestellt, und die K-Emission in Abhängigkeit von der Entfernung zu den Erythrozyten bestimmt.

Abb. 15 zeigt die Intensität der Kalium- K_{α} -Linie in Abhängigkeit vom Abstand (Abszisse) zur Erythrozytengrenze. Das Rasterfeld war $0.1 \times 0.1 \mu$. Nach dem konventionellen 10%-Kriterium ergibt sich eine Auflösung von ca. 1μ (Pfeile in Abb. 15).

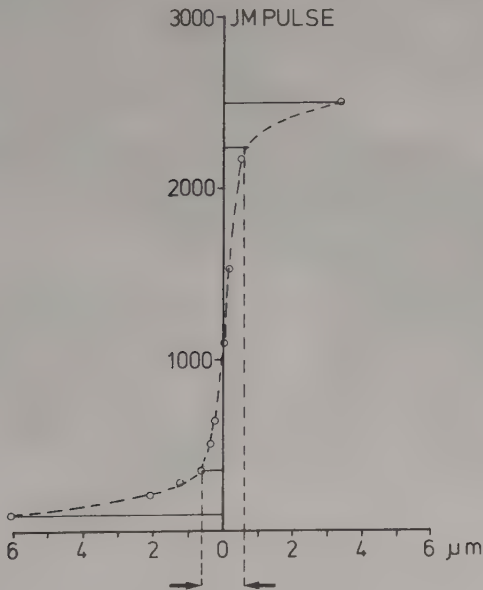


Abb. 15: Der Verlauf der Intensität der K_{α} -Linie von Kalium beim Überschreiten der Erythrozytenmembran.

3. Die Elektronenstrahlmikroanalyse an massiven tiefgefrorenen Präparaten

Zur Klärung der Frage, wie weit die Analyse von tiefgefrorenem Gewebe in technisch nicht zu aufwendiger Weise realisierbar ist, wurden bisher einige grundlegende Versuche durchgeführt.(8).

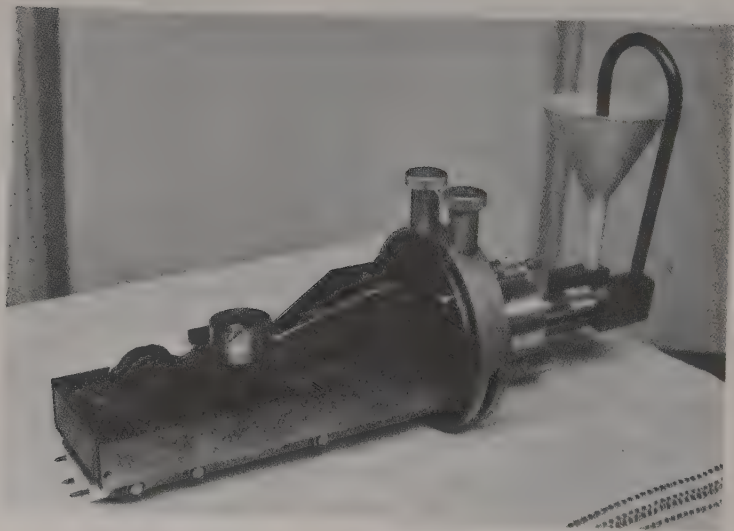


Abb. 16: Probenbühne mit Kühlvorrichtung zur Analyse von tiefgefrorenen Präparaten.

Abb. 16 zeigt die Probenbühne des Cambridge-Rastermikroskops, die zu diesem Zweck so umgebaut wurde, daß das Präparat während der Analyse bei -150°C gehalten werden konnte. In den Trichter wird flüssiger Stickstoff eingefüllt, der durch ein Kupferrohr in ein Kühlreservoir fließt. Ein kräftiges Kupferband verbindet

das Reservoir und den justierbaren Probestisch. Die Stellen des Probestisches, die mit der übrigen Bühne in Kontakt stehen, sind zur Wärmeisolation aus Kunststoff gefertigt. Unter dem Tisch ist ein Faradayzylinder zur Messung des Strahlstroms montiert. Der Probenhalter (Abb. 17) besteht aus einer Trommel (links in Abb. 17), in die die Zangen mit den Präparaten unter 45° geneigt – oder senkrecht – eingesetzt werden können, und aus einer (rechts in Abb. 17) Dose, die über die Trommel gesteckt wird. Diese kann von außen so gedreht werden, daß das gewünschte Präparat in Meßposition kommt. Die auf dem Probestisch arretierte Dose hat für das Präparat in Meßposition eine Aussparung. Die Zange mit dem Präparat wird unter flüssigem Stickstoff in die Trommel gesteckt und mit der Dose abgedeckt.



Abb. 17: Probenhalter und Probenabdeckung.

Ist der Probenstisch vorgekühlt, so wird der Probenhalter mit dem abgedeckten Präparat aus dem flüssigen Stickstoff genommen und auf den Tisch gesetzt. Die Probenbühne wird in die Kammer gefahren und ein Vakuum hergestellt. Das Präparat wird erst im Vakuum durch Drehen in die Aussparung der Dose gebracht. Auf diese Weise wird vermieden, daß sich auf der Oberfläche des Präparates störende Eiskristalle niederschlagen.

In erster Linie galt es zu klären, ob bei Strahlströmen, die eine genügende Zählrate liefern, die Wärmeleitfähigkeit des gefrorenen Präparates ausreicht, die Wärme, die an der Beschußstelle entsteht, soweit abzuführen, daß dort keine Sublimation des Eises auftritt. Hierzu wurde auf einem Eichpräparat eine Fläche von 0.3×0.3 mm und eine kleine Fläche von $1 \times 1 \mu$ 400 sec lang mit einem Strahlstrom von $5 \cdot 10^{-9}$ A bei 20 KV Beschleunigungsspannung analysiert. Dabei wurden Zählraten von ca. 4000 cps erzielt. Die so gewonnenen Spektren zeigt Abb. 18. Bei der Messung auf dem kleinen Areal sind sowohl die Linien als auch der Untergrund niedriger als bei der Messung auf dem großen Areal, was auf Unterschiede in der Geometrie zurückzuführen ist. Dagegen ist in beiden Fällen das Signal- zu Untergrundverhältnis gleich, während bei Messung auf derselben, aber gefriergetrockneten Eichlösung das Signal- zu Untergrundverhältnis um etwa einen Faktor 5 größer ist. Wäre während der Messung mit hoher Strombelastung (kleine Rasterfläche) Eis absublimiert, dann wären in der dort entstandenen gefriergetrockneten Albuminlösung lokal die Elektrolytkonzentrationen gestiegen und hätten für die Elektrolyte ein höheres Signal- zu Untergrundverhältnis verursacht. Man kann somit aus diesem Experiment den Schluß ziehen, daß bei den gewählten Bedingungen kein Eis absublimiert. Bei Verdoppelung des

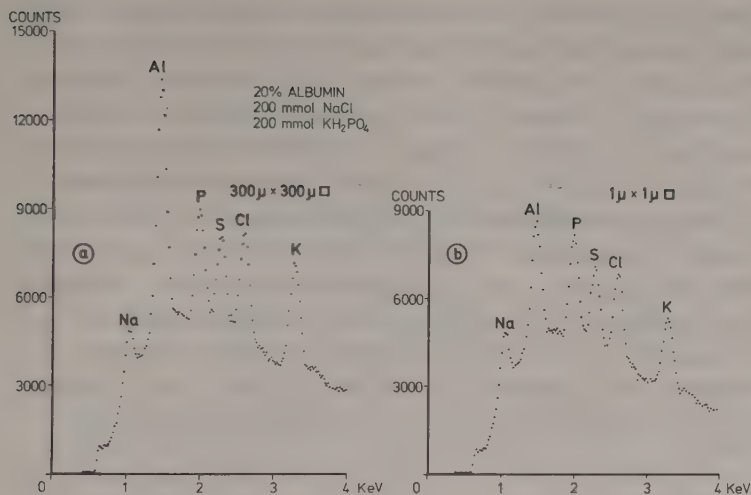


Abb. 18: Vielkanalspektren einer tiefgefrorenen Eichlösung:
(a) Meßfläche 300 x 300 μ , Meßdauer 400 sec
(b) Meßfläche 1 x 1 μ , Meßdauer 400 sec.

Strahlstroms dagegen konnte eine Sublimation beobachtet werden, so daß eine Präparatbelastung von ca. $5 \cdot 10^{-9} \text{ A}/\mu^2$ bei 20 KV Beschleunigungsspannung noch tolerierbar erschien.

In diesem Experiment wurde die Anregungsspannung so hoch gewählt, damit für die Wärmeableitung relativ ungünstige Bedingungen vorliegen. Bei kleineren Spannungen, die ein kleineres angeregtes Volumen bedingen, sollte das günstigere Verhältnis von Oberfläche zu Vo-

lumen eine bessere Wärmeableitung ermöglichen. Vernachlässigt man diesen Effekt, so kann von den bei 20 KV ermittelten Bedingungen grob auf tolerierbare Strahlströme bei kleineren Anregungsspannungen umgerechnet werden. Im Gleichgewicht gilt für das angeregte Volumen $E_0 J_0 = \lambda_w F \cdot \Delta T$. E_0 ist die Anregungsspannung, J_0 ist der Strahlstrom, $E_0 \cdot J_0$ ist etwa die durch den Strahl im angeregten Volumen erzeugte Wärme, λ_w ist die Wärmeleitfähigkeit des gefrorenen Präparates, die i.a. nicht bekannt ist, F ist die Fläche des angeregten Volumens, ΔT ist der Temperaturgradient des angeregten Volumens zur Umgebung. F sei proportional zum Quadrat der Eindringtiefe, nach (9) ist diese proportional $E_0^{1.7}$

Somit ist

$$\frac{J_0}{E_0^{2.4}} \propto \lambda_w \cdot \Delta T$$

ΔT soll den in unserem Experiment erreichten Wert nicht überschreiten, so daß das Verhältnis $J_0/E_0^{2.4}$ für eine andere Anregungsspannung gleich sein soll. Wird sie z.B. auf 5 KV reduziert, so ist die Eindringtiefe bzw. Röntgenauflösung $\sim 1 \mu$ und für die Anregung von Natrium besteht noch ein gutes Überspannungsverhältnis. Nach den obigen Überlegungen wäre noch ein Strom von ca. $1.8 \cdot 10^{-10}$ A tolerierbar, der dann allerdings nur noch Zählraten von bestenfalls 160 cps liefern würde. Für die Anregung von Kalium ist eine Spannung von 10 KV notwendig. Für diesen Fall ist die Eindringtiefe 3μ und ein Strom von 10^{-9} tolerierbar, der eine Zählrate von ca. 800 cps liefert.

Eine weitere unbekannte Materialgröße des gefrorenen Präparates ist die elektrische Leitfähigkeit λ_{el} . Nach

Abschätzungen von Bornbach et al. (persönliche Mitteilung) ist λ_{el} so klein, daß in Millisekunden nach Einschalten des Strahls die Beschüßelektronen, die nicht abwandern können, ein Potential erzeugen, das das weitere Eindringen von Elektronen verhindert, so daß das angeregte Volumen, das anfänglich die Gestalt einer Birne hatte, pfannenkuchenartig deformiert wird. Wie weit dieser Effekt auf die Analyse Einfluß hat, und wie weit er durch schnelles Rastern oder beam-blanking vermieden werden kann, läßt sich z.Zt. noch nicht sagen.

Eine andere Schwierigkeit bei der Analyse von gefrorenem Material ist die Lokalisation des Elektronenstrahls. Für eine quantitative Analyse ist es notwendig, mit einer Oberfläche ohne Rauigkeit zu arbeiten. Wegen der geringen Ordnungszahlunterschiede in biologischem Gewebe genügen die rückgestreuten Elektronen nicht zur Kontrasterzeugung und die Intensität der Kathodolumineszenz dürfte i.a. auch zu schwach sein. Nachdem aber die Röntgenauflösung nie besser sein wird als 1μ , sollte ein Auflichtmikroskop mit Fadenkreuz genügen.

4. Auswertung der Vielkanalspektren

Eine der Voraussetzungen für eine quantitative Analyse ist die Auswertung der Vielkanalspektren, die aus dem Untergrund und den Linien bestehen. Der Untergrund ist ein Maß für die Masse des angeregten Volumens (s. Kapitel 5). Seine Form ist bestimmt durch den Wirkungsquerschnitt σ_w für die Erzeugung weißer Strahlung (Bremsstrahlung) und durch die Absorption der Strahlung im Berylliumfenster des Spektrometers. $\sigma_w(E, \epsilon)$ gibt die Wahrscheinlichkeit an, daß ein Elektron mit der kineti-

schen Energie E bei seiner Abbremsung im Feld der Kernladung eines Targetatoms ein Röntgenquant der Energie ε erzeugt.

Nach Bethe und Heitler (5) ist

$$\sigma_w(E, \varepsilon) \propto \frac{1}{E} \ln \frac{(\sqrt{E} + \sqrt{E - \varepsilon})^2}{\varepsilon} \quad \text{Gl. 1}$$

(Von der Anisotropie und Kernladungszahlabhängigkeit von σ_w wurde hier abgesehen).

Dieser Verlauf von σ_w ist in Abb. 19 dargestellt. Die Absorption der Strahlung im Berylliumfenster hängt ab von der Röntgenenergie. Weiche Strahlung wird stärker absorbiert als harte. Nach den Lehrbüchern der Physik (z.B. 10)) gilt

$$I(\varepsilon) = I_0(\varepsilon) e^{-\mu(\varepsilon)x}$$

$I_0(\varepsilon)$ ist die Intensität der Strahlung der Energie ε , bevor sie das Fenster durchdrungen hat, $I(\varepsilon)$ danach. x ist die Dicke des Fensters, $\mu(\varepsilon)$ ist der Absorptionskoeffizient, für den gilt

$$\mu(\varepsilon) \propto \frac{1}{\varepsilon^3}$$

Dadurch wird die ursprüngliche Form der Bremsstrahlung (s. Abb. 19) geändert, so daß sich mit unserem System ein Verlauf ergibt, der in Abb. 20 dargestellt ist. Die starke ε -Abhängigkeit des Absorptionskoeffizienten verhindert, daß Röntgenquanten, deren Energie kleiner als ca. 750 eV ist, nachgewiesen werden können.

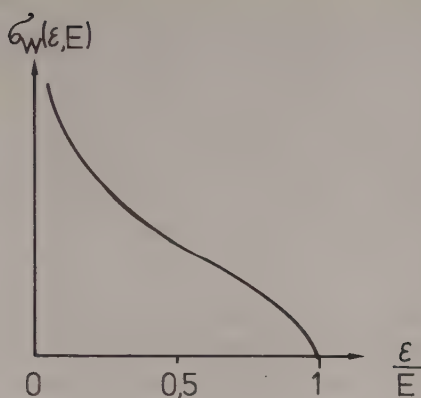


Abb. 19: Der Verlauf der Bremsstrahlung nach Bethe und Heitler aus (5).

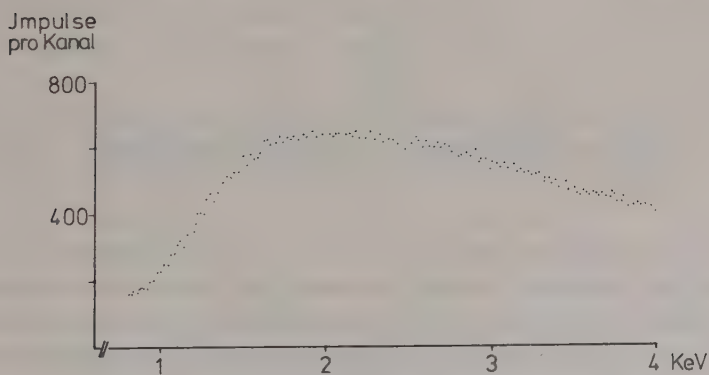


Abb. 20: Der Verlauf der Bremsstrahlung nach dem Durchdringen des Berylliumfensters.

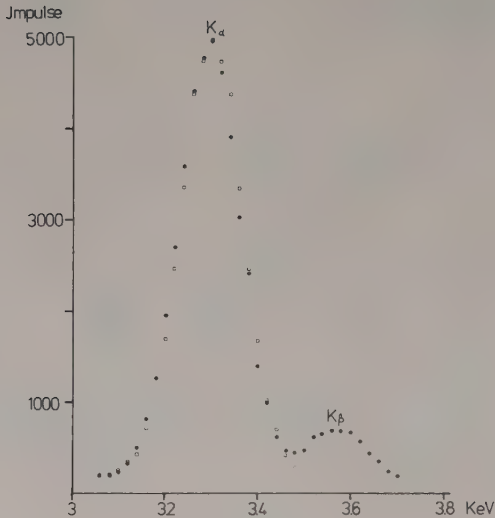


Abb. 21: Vergleich einer gemessenen Linie (Punkte) mit einer berechneten Gaußkurve (Quadrate).

Die Intensität der Linien ist ein Maß für die Menge des betreffenden Elements im angeregten Volumen (s. Kapitel 5). Ihre natürliche Breite ist kleiner als 1 eV. Durch das Auflösungsvermögen des Spektrometers werden sie zu einer Form verbreitert, die – wie Abb. 21 zeigt – durch eine Gaußkurve dargestellt werden kann.

Die Kontinuumsfluoreszenz ist nach einer Abschätzung von Hall (7) kleiner als 1%, so daß Absorptionskanten in den Spektren vernachlässigt werden können.

Im Spektrum eines aktuellen Präparats liegen Untergrund und Linien in einer Linearkombination vor. Man bekommt die im Spektrum enthaltene Information, indem man Untergrund und Linien trennt und die einzelnen Intensitäten (Flächen) bestimmt.

Ein sehr einfaches Verfahren, das bisher verwendet wurde, besteht darin, den Untergrund unter den Linien durch ein Polygon zu approximieren, wie das in Abb. 22 dargestellt ist. Ein weiteres Verfahren wird z.Zt. ausgearbeitet. Dem Rechner werden dabei aus Messungen an reinen Elementen gewonnene Linien vorgegeben. Vom aktuellen Spektrum werden schrittweise Bruchteile dieser Linie solange abgezogen, bis nur noch der nackte Untergrund stehen bleibt. Das Kriterium, wann eine Linie des aktuellen Spektrums vollständig abgetragen ist, ist in Abb. 23 schematisch dargestellt und lautet:

$$\frac{1}{5} \sum_{K-2}^{K+2} C_i - \frac{1}{2} \left(\frac{1}{5} \sum_{K-7}^{K-3} C_i + \frac{1}{5} \sum_{K+3}^{K+7} C_i \right) = \rho'_K = \rho_K \cdot \frac{1}{2} \left(\frac{1}{5} \sum_{K-7}^{K-3} C_i + \frac{1}{5} \sum_{K+3}^{K+7} C_i \right)$$

Dabei liegt die Linie, die abgezogen werden soll, um den Kanal k , C_i ist die Zahl der Impulse im Kanal i (bei jedem Schritt der Iteration), ρ_K ist eine Zahl, die die Krümmung des Untergrunds an der Stelle der Linie angibt. Sie wird aus einem reinen Bremsspektrum ermittelt und ist z.B. für Na $\rho_K = -3 \cdot 10^{-2}$ oder für K $\rho_K = -1.5 \cdot 10^{-2}$ (Das Minuszeichen berücksichtigt die Konkavität

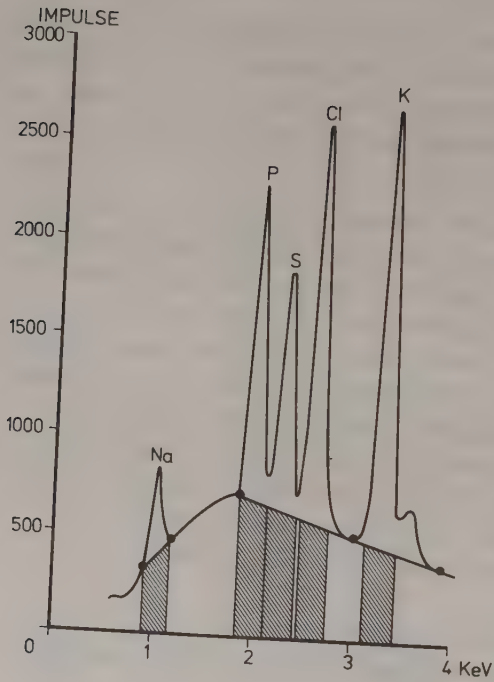


Abb. 22: Die Approximation des Untergrunds durch ein Polygon.

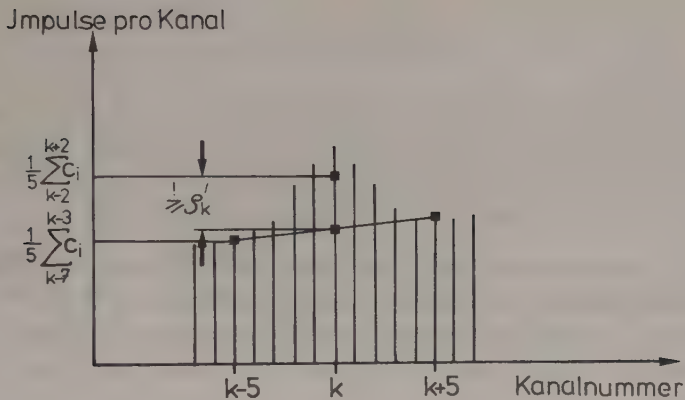


Abb. 23: Veranschaulichung des Abbruchkriteriums für das Abziehen von Linien in einem Rechenprogramm.

des Untergrunds). Zur Mittelwertbildung kann man auch mehr oder weniger als fünf Kanäle verwenden. In einem dritten Verfahren wird die Tatsache ausgenutzt, daß jedes Spektrum eine Linearkombination ist*. Dem Rechner werden - wie oben - die Linien der Elemente vorgegeben und zusätzlich ein Untergrundspektrum, das an einer ca. $1/2 \mu$ dicken Kollodiumfolie gemessen wurde. Für die beste Darstellung eines aktuellen Spektrums $S(\epsilon)$ durch die Linearkombination soll das Integral des Quadrats der Abweichung ein Minimum sein:

$$\int (S(\epsilon) - \sum_i \beta_i f_i(\epsilon))^2 d\epsilon \stackrel{!}{=} \min$$

Für die Erstellung des Rechenprogramms und für die Durchführung der Rechnungen danke ich Herrn Dr. Kampmann, MPI für Biophysik, Frankfurt/M.

$f_i(\varepsilon)$ sind die Standardspektren für Linien und Untergrund, β_i sind die Koeffizienten der Linearkombination. Diese Forderung liefert für die β_i ein lineares Gleichungssystem, das mit einem Rechner gelöst werden kann.

Abb. 24 zeigt ein Spektrum eines Schnittes einer 20%igen Albuminlösung zusammen mit der aus Standardspektren von Linien und Untergrund gebildeten Linearkombination, die dieses Spektrum approximiert.

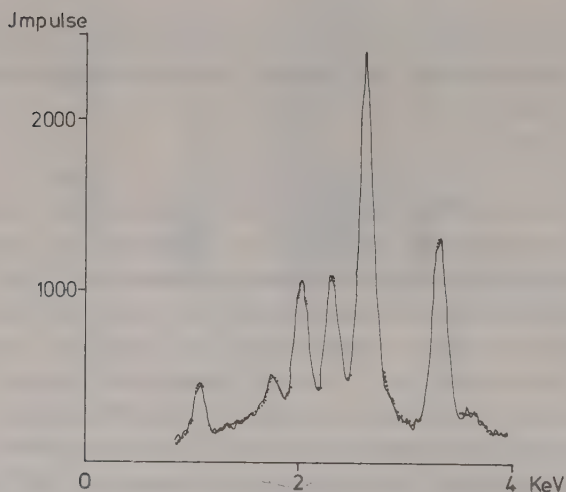


Abb. 24: Gemessenes Spektrum eines Albuminschnittes (durchgezogene Linie) und synthetisches Spektrum (Punkte), das das gemessene approximiert.

5. Quantifizierung

a) Quantifizierung an Dünnschnitten

Ein Elektronenstrahl, der auf einen Schnitt fällt, wird durch elastische und inelastische Stöße kegelförmig deformiert. Die Substanz, die innerhalb des Kegels ist, wird zur Röntgenemission angeregt und liegt im sogenannten angeregten Volumen (Abb. 25). Die Energieverteilung $\phi(E, Z)$ der Beschüßelektronen ändert sich im angeregten Volumen in charakteristischer Weise. Die anfangs scharfe Verteilung wird je nach der Tiefe Z im Schnitt breiter und zu tieferen Energien verschoben, wie es in Abb. 26 schematisch dargestellt ist.

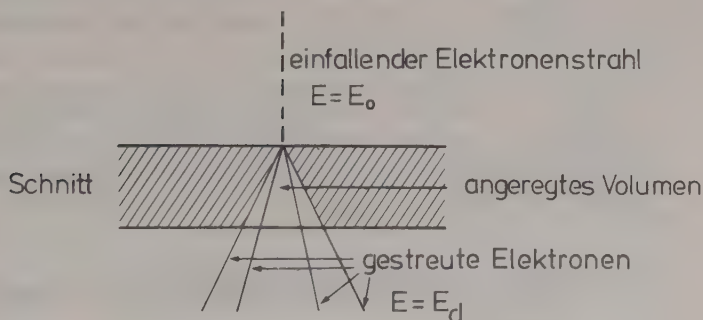


Abb. 25: Schema des angeregten Volumens in einem Dünnschnitt.

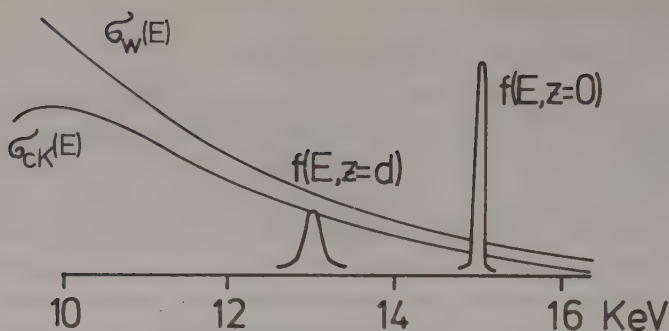


Abb. 26: Schema des Verlaufs der Energieverteilung $f(E, z)$ der Beschuss-Elektronen in einem Dünnschnitt und Energieabhängigkeit der Wirkungsquerschnitte für weiße $\sigma_w(E)$ und für charakteristische $\sigma_K(E)$, K = Kalium) Röntgenstrahlung.

Die Zahl der charakteristischen Röntgenquanten eines Elementes i , die im angeregten Volumen durch Ionisation und anschließenden strahlenden Übergang erzeugt werden, ergibt sich als

$$n_i = J_0 N_i \eta_i \int_{E=0}^{\infty} \int_{z=0}^d \sigma_{ci}(E) f(E, z) dE dz \quad (\text{Gl. 2})$$

N_i ist die Dichte der Atome des Elementes i im angeregten Volumen in $[\frac{\text{mol}}{\text{cm}^3}]$. J_0 ist der Strahlstrom, η_i ist die Fluoreszenzausbeute, d ist die Dicke des Schnittes. $\sigma_{ci}(E)$ ist der Wirkungsquerschnitt für die Ionisation und hat nach Bethe (11) die Form

$$\sigma_{ci}(E) \propto \frac{1}{EE_{ji}} \ln \frac{E}{E_{ji}} \quad (\text{Gl. 3})$$

E_{ji} ist die Ionisationsenergie des Elements i für das Elektron j . Nach Gl. 3 hat σ_{ci} ein Maximum bei $E = 2.7 E_{ji}$, z.B. für Kalium (Ionisation der K-Schale) bei 10 KeV. Der Wirkungsquerschnitt wird also, wie in Abb. 26 angedeutet, mit der Energieverteilung gefaltet.

Abb. 27 soll diese Verhältnisse veranschaulichen. Aufgetragen ist die charakteristische Emission als Funktion der Anregungsspannung bei gleichen Strahlströmen, gemessen an 2.5 μ dicken Albumin-Standard-schnitten. Man erkennt die Form der σ_{ci} . Allerdings sind die Maxima nach rechts verschoben. Z.B. ist für Kalium das Maximum bei 12 KV anstatt - wie aus Gl. 3 zu erwarten - bei 10 KV. Daraus läßt sich schließen, daß auf 12 KV beschleunigte Beschußelektronen im angeregten Volumen eines 2.5 μ dicken Schnittes im Mittel nurmehr eine Energie von 10 KeV haben, was mit Abschätzungen des Energieverlustes nach Coslett und Thomas (9) übereinstimmt.

Die Zahl der weißen Röntgenquanten der Energie ϵ ergibt sich analog

$$n_w(\epsilon) = \sum_i N_i \iint \sigma_{wi}(E, \epsilon) f(E, z) dE dz$$

Die Summe geht über alle Elemente im angeregten Volumen. $\sigma_{wi}(E, \epsilon)$ läßt sich darstellen als $\sigma_{wi}(E, \epsilon) = F(Z_i) \sigma_w(E, \epsilon)$ und ist also das Produkt aus einem kernladungszahlunabhängigen Anteil (Gl. 1) und einem Anteil $F(Z_i)$, in den die Koppelung des Beschußelek-

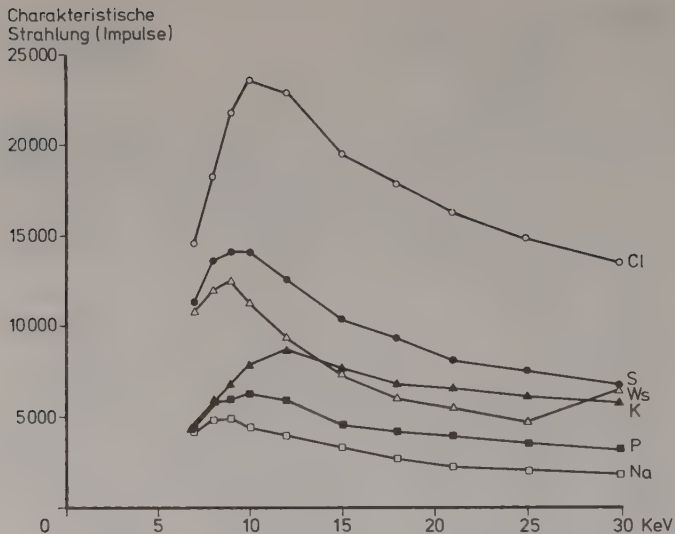


Abb. 27: Die charakteristische Emission (Na, P, S, Cl, K) und die weiße Emission (Ws) in demselben Dünnschnitt als Funktion der Beschleunigungsspannung.

trons an den Kern des Atoms i eingeht. Wäre die Kernladung $Z_i \cdot e$ nicht durch die Elektronenhülle abgeschirmt, dann wäre dieser Anteil gemäß der goldenen Regel der Quantenmechanik proportional Z_i^2 . Eine einfache Behandlung der Abschirmung liefert eine Z -Abhängigkeit, die in Abb. 28 dargestellt ist. Der Querschnitt, den ein Atom einem Beschußelektron darbietet, wurde in Ringflächen aufgeteilt. Ein Elektron, das innerhalb der 1. Bohrschen Bahn auftrifft, spürt

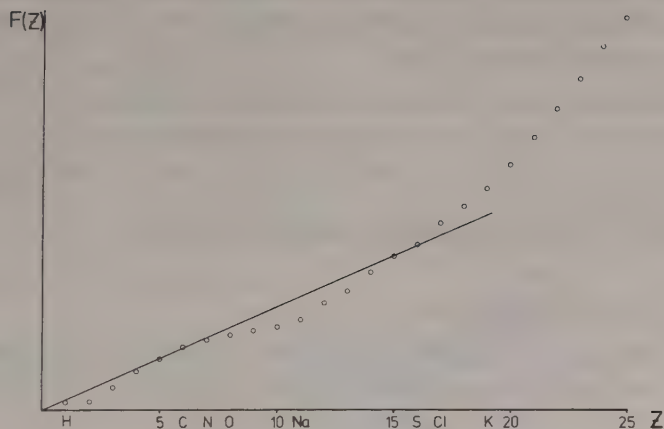


Abb. 28: Die Abhängigkeit der Funktion $F(Z)$ (s. Text) von der Ordnungszahl nach einem einfachen Modell berechnet.

die volle Kernladung, so daß diese Fläche zum Gesamtwirkungsquerschnitt mit $Z^2 r_1^2 \pi$ ($r_1 = \frac{1}{Z}$) beiträgt. Ein Elektron, das zwischen 1. und 2. Bahn auftrifft, spürt von der Kernladung nur noch $(Z-2)$, so daß diese Fläche mit $(Z-2)^2 (r_2^2 \pi - r_1^2 \pi)$ beiträgt ($r_2 = \frac{2^2}{Z}$) usw. Auf diese Weise wurde bis $Z = 25$ (Mn) der Faktor $F(Z)$ berechnet. Die Bohrschen Radien sollten den mittleren Abstand $\langle \psi | r | \psi \rangle$ der Elektronen vom Kern für eine mehr qualitative Betrachtung der Elemente niedriger Ordnungszahl hinreichend gut wiedergeben.

Das mit diesen Annahmen berechnete $F(Z)$ soll mit Hilfe der Daten von Hehenkamp et al. (12) geprüft werden, die die Intensität der Bremsstrahlung einer bestimmten Energie als Funktion der Ordnungszahl an massiven Elementstandards ermittelten.

Beim Beschuß einer massiven Probe des Elements i ist die Zahl der erzeugten weißen Quanten der Energie $\mathcal{E}$

$$n_{wi}(\mathcal{E}) = \int_0^d N_i \int \sigma_{wi}(E', \mathcal{E}) f(E', z) dE' dz$$

$i=0$

d ist die Eindringtiefe.

Die Integration wird statt über z besser über die Energie E der Beschußelektronen durchgeführt:

$$n_{wi}(\mathcal{E}) = \int_{E=E_0}^{\mathcal{E}} N_i \int \sigma_{wi}(E', \mathcal{E}) f(E', E) dE' \left(\frac{dz}{dE} \right) dE$$

Die Integration geht nur bis $E = \mathcal{E}$, weil Beschußelektronen mit $E < \mathcal{E}$ keine weiße Strahlung der Energie $\mathcal{E}$ erzeugen können.

dE ist der Energieverlust der Beschußelektronen in einer Schicht der Dicke dz , der hauptsächlich durch Ionisation bedingt ist. Mit dem Wirkungsquerschnitt für die Ionisation nach Bethe (Gl. 3) ist

$$dE = -V_i dz \sum_j E_{ji} \sigma_{ji}(E_j) = -N_i dz \sum_j \frac{1}{E} \ln \frac{E}{E_{ji}}$$

Die Summation wird über alle Elektronen des Atoms der Ordnungszahl Z_1 durchgeführt.

In einem der Experimente von Hehenkamp et al. ist $E = 10$ KeV und $\mathcal{E} = 7,5$ KeV ($A = 1,66 \text{ \AA}$). Das bedeutet, daß

die nachgewiesenen weißen Quanten nur in einer sehr oberflächlichen Schicht der Präparate erzeugt werden, in der die Verteilung der Beschußelektronen $f(E', E)$ noch relativ scharf ist, so daß man schreiben kann:

$$f(E', E) = \delta(E' - E)$$

Die mittlere Ionisationsenergie der hier betrachteten Elemente ist wesentlich kleiner als 7,5 KeV, so daß der in Bornscher Näherung berechnete Ionisationsquerschnitt von Bethe verwendet werden kann.

Mit Gl. 1 bekommt man

$$n_{wi}(7,5) \approx \int_0^{10} F(Z_i) \frac{\ln \frac{(E' + |E - \epsilon|)^2}{\epsilon}}{\sum_j \ln \frac{E}{E_{ji}}} dE$$

Im Integrationsbereich ändern sich die $\ln \frac{E}{E_{ji}}$ nur wenig, so daß die Summe vor das Integral gezogen werden kann:

$$n_{wi}(7,5) \approx \frac{F(Z_i)}{\sum_j \ln \frac{E}{E_{ji}}} \cdot \int_0^{10} \dots dE$$

Der Quotient vor dem Integral enthält jetzt die gesamte Ordnungszahlabhängigkeit und wurde mit den Ionisationsenergien des Bohrschen Modells $E_{ni} = \frac{Z_i^2}{n^2} \cdot 13 [\text{eV}]$ (n ist die Hauptquantenzahl) berechnet. Die so gewonnene Ordnungszahlabhängigkeit der Intensität $I(Z)$ der weißen Strahlung ist in Abb. 29 aufgetragen und zeigt zufriedenstellende Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Hehekamp et al. bei $E_0 = 10 \text{ KeV}$ und $\epsilon = 7,5 \text{ KeV}$.

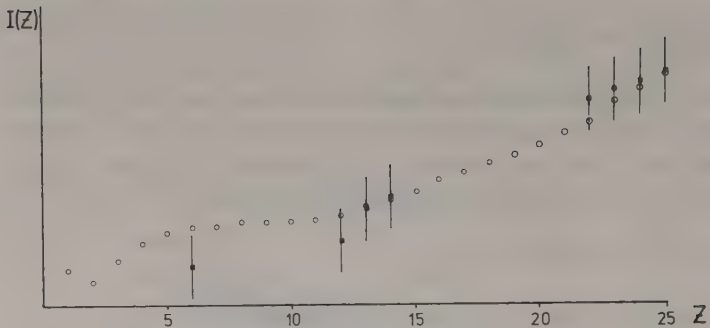


Abb. 29: Die Intensität der Bremsstrahlung bei $E_0 = 10$ KeV und $\lambda = 1,66 \text{ \AA}$, aufgetragen gegen die Ordnungszahl. Die Kreise stellen die berechneten Werte dar, die Quadrate die experimentellen Werte nach (12).

Die Abschirmung der Kernladung bedingt also, zumindest im Bereich der hier interessierenden leichten Elemente, eine Ordnungszahlabhängigkeit von $F(Z)$, die schwächer als Z^2 ist. Biologisches Material besteht zum größten Teil aus den Elementen H, C, N, O und Na, P, S, Cl, K, für die $F(Z)$ gut durch eine Gerade approximiert werden kann (s. Abb. 28). Im Bereich dieser Elemente gilt auch $A = 2Z$, so daß man für die weiße Strahlung schreiben kann:

$$n_w(\varepsilon) \propto \rho \int_0^d \sigma_w(E, \varepsilon) f(E, z) dE dz \quad (\text{Gl. 4})$$

ρ ist die Massendichte im angeregten Volumen in g/cm^3 .
Im allgemeinen integriert man $n_w(\varepsilon)$ entweder über einen ε -Bereich um eine Linie oder über einen größeren Abschnitt des Spektrums, was im weiteren mit n_w angedeutet werden soll.

In Abb. 30 ist das Verhältnis von charakteristischer Strahlung zu weißer Strahlung um die betreffende Linie, gegen die Beschleunigungsenergie aufgetragen, gemessen an $2,5 \mu$ dicken Standardschnitten.

Bei genügend hohen Anregungsspannungen ist diese Energieabhängigkeit durch den Quotienten der Wirkungsquerschnitte bestimmt und kann mit Gl. 3 und Gl. 1 berechnet werden

$$\frac{\sigma_{ci}(E)}{\sigma_w(E, \varepsilon = E_{ji})} = \frac{\ln x}{\ln(\sqrt{x} + \sqrt{x-1})} \xrightarrow{x \gg 1} \frac{1}{1 + \frac{\ln 4}{\ln x}}$$

d.h. für Beschleunigungsspannungen, die groß sind gegenüber der Ionisationsenergie, nähert sich das Signal zu Untergrundverhältnis einer Linie einem konstanten Wert. Dieses Verhalten ist in Abb. 30 gut erkennbar, erfährt allerdings eine drastische Änderung bei hohen Energien. Das läßt sich auf elastisch rückgestreute Beschußelektronen zurückführen, die das zum Nachweis der Natriumstrahlung sehr dünn (ca. $7,5 \mu$) gehaltene Berylliumfenster des Detektors durchdringen, und am Halbleiterkristall Impulse auslösen.

In Abb. 31 ist die Eindringtiefe von Elektronen im Beryllium ($\rho = 1,89 \text{ g/cm}^3$) gegen die Energie aufgetragen

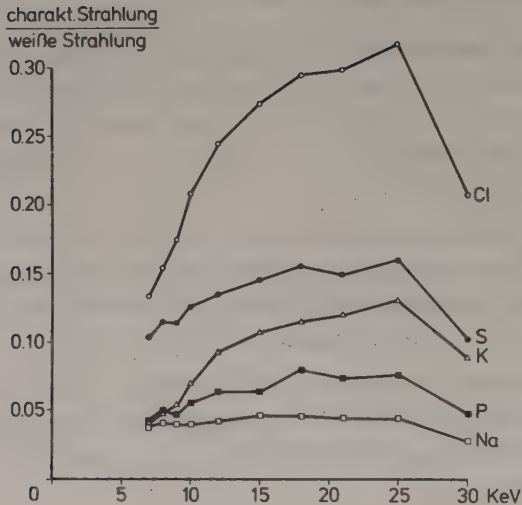


Abb. 30: Das Signal- zu Untergrundverhältnis der Linien als Funktion der Beschleunigungsspannung, gemessen an 2,5 μ dicken Standardschnitten.

(Coslett und Thomas (9)). Für Beschleunigungsspannungen über 24 KV muß also mit einer Verfälschung des Untergrundes, vor allem im niederenergetischen Bereich, gerechnet werden.

Die Konzentration eines Elementes im angeregten Volumen ergibt sich aus Gl. 2 und Gl. 4:

$$c_i = \frac{N_i}{S} = \alpha_i \frac{n_i}{n_w} \left[\frac{\text{mol}}{\text{g Trockengewicht}} \right] \quad (\text{Gl. 5})$$

mit

$$\alpha_i = \frac{\int \sigma_w(E, z) \phi(E, z) dE dz d\epsilon}{\int \sigma_i(E) \phi(E, z) dE dz}$$

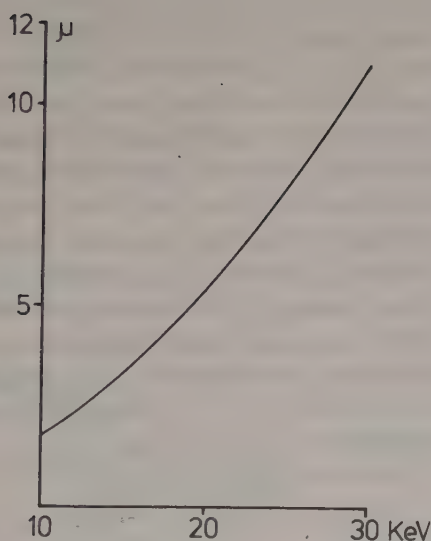


Abb. 31: Die Eindringtiefe von Elektronen in Beryllium als Funktion der Beschleunigungsspannung nach (9) berechnet.

Ist der Schnitt hinreichend dünn, oder die Beschußenergie hinreichend hoch, so bleibt (s. Abb. 26) die Energieverteilung $f(E, z)$ im Schnitt so scharf, daß in dem Bereich, wo $f \neq 0$ ist, sowohl σ_{ci} als auch σ_w sich annähernd gleich ändern. Der Faktor α_i ist damit in guter Näherung von der Schnittdicke unabhängig und kann mit Messungen an ebenfalls dünnen Standardschnitten bestimmt werden. Das ist der Inhalt der von Hall (7) angegebenen Methode.

Da nach Coslett und Thomas (9) der Energieverlust der Beschüßelektronen in einem Schnitt berechnet werden kann und die Energieabhängigkeit von σ_{ci} nach Bethe (11) und diejenige von σ_w nach Bethe und Heitler (5) bekannt ist, läßt sich abschätzen, wie stark das Verhältnis $\frac{n_i}{n_w}$ bei gleicher Konzentration mit der Massendichte eines Schnitts variiert. Damit läßt sich der Geltungsbereich der Methode von Hall für bestimmte Meßbedingungen ermitteln. Dies sei an einem Beispiel demonstriert. In einem Schnitt von 2 μ Dicke und der Dichte $\rho = 0,2 \text{ g/cm}^3$ werden 20 KV Beschüßelektronen im Mittel auf 19 KV abgebremst. Für Kalium ist an der Oberseite des Schnittes das Verhältnis

$$\frac{\sigma_{cK}(E=20)}{\sigma_w(E=20, \varepsilon=3.3)} \propto 0.222$$

und an der Unterseite

$$\frac{\sigma_{cK}(E=19)}{\sigma_w(E=19, \varepsilon=3.3)} \propto 0.208$$

Somit ist das mittlere Verhältnis n_i/n_w in diesem Schnitt proportional zu 0,215. Das entspricht dem gemessenen Signal zu Untergrundverhältnis der Kalium K_{α} -Linie. In einem Schnitt, der die doppelte Massenbelegung $[\frac{g}{cm^2}]$ hat, werden 20 KV Elektronen auf ca. 18 KeV abgebremst. Es ist an der Unterseite dieses Schnittes das Verhältnis

$$\frac{\sigma_{cK}(E=18)}{\sigma_w(E=18, \varepsilon=3.3)} \propto 0.195$$

Das mittlere Verhältnis n_i/n_w ist jetzt 0,208. Das bedeutet, daß trotz gleicher Konzentration das Signal zu Untergrundverhältnis wegen der größeren Massenbelegung um ca. 3% kleiner wurde. Daher würde mit einer Eichung für Kalium (Bestimmung des α_K in Gl. 5) mit Standardschnitten der Massenbelegung $0,4 \cdot 10^{-4} [\frac{g}{cm^2}]$

für ein Präparat der doppelten Massenbelegung das Kalium um 3% zu niedrig bestimmt werden.

Mit dem bisher ausgeführten Verfahren bekommt man die Konzentration pro Trockengewicht. Um daraus die Konzentration pro Feuchtgewicht bestimmen zu können, ist die Kenntnis der Trockenmasse an der Meßstelle erforderlich. Hierzu ist es vorteilhaft, wenn es gelingt, in der oben beschriebenen Weise das Gewebe zusammen mit einer Eichlösung zu schneiden, die als interner Standard verwendet werden kann. Die weiße Strahlung von internem Standard und Gewebe liefert die Trockenmasse wie folgt: Zwischen weißer Strahlung und Massenbelegung besteht nach Gl. 4 eine Beziehung, die man entweder experimentell bestimmen oder mit den bekannten Formeln für und den Energieverlust der Beschußelektronen mit einem $f(E, Z)$ berechnen kann. Die mittlere Energie der Beschußelektronen in der Tiefe berechnet sich nach Coslett und Thomas (9) aus

$$Z\rho = f(E_0^{1/2} - E_z^{1/2})$$

$$Z [\mu]$$

$$\rho [g/cm^2]$$

$$E [KeV]$$

$$f = 0,064$$

Für kleine Massenbelegungen kann man für $f(E, Z)$ die Annahme machen: $f(E, Z) = \delta(E - E_z)$.

Das bedeutet, daß die Verbreiterung, die f im Schnitt erfährt, vernachlässigt wird. Für dünne Schnitte ist

$\frac{d\rho}{\rho} \ll E_0^{1/2}$ und der Teil von σ_w , der zum Integral beiträgt, kann durch eine Gerade approximiert und σ_w an der Stelle $E = \frac{E_d}{2}$ vors Integral gezogen werden.

Damit wird:

$$n_w(\varepsilon) \propto d\rho \frac{1}{\left(E_0^{1,7} - \frac{d\rho}{2\rho}\right)^{\frac{1}{1,7}}} \cdot \ln \frac{\left(\sqrt{E_{\frac{d}{2}}} + \sqrt{E_{\frac{d}{2}} - \varepsilon}\right)^2}{\varepsilon}$$

Die Dichteabhängigkeit des $\ln$ -Terms wird vernachlässigt und der Quotient entwickelt:

$$n_w(\varepsilon) \propto \ln \frac{(\sqrt{E_0} + \sqrt{E_0 - \varepsilon})^2}{\varepsilon} \cdot \frac{d\rho}{E_0} \left(1 + \frac{1}{1,7} \frac{d\rho}{2\rho E_0^{1,7}} + \dots\right)$$

Hiermit läßt sich grob abschätzen, bei welcher Massenbelegung die Abhängigkeit der weißen Strahlung von ρ um 10% von der Linearität abweicht. Für $E_0 = 15$ KeV und $\rho = \frac{1}{5} \left[\frac{g}{cm^3}\right]$ wäre das z.B. bei einer Schnittdicke von 10μ , während das Experiment bereits bei ca. 5μ die 10%ige Abweichung von der Linearität zeigt. Der Grund dieser Diskrepanz liegt in der Vernachlässigung der Verbreiterung von f , wodurch gerade die niederenergetischen Elektronen nicht berücksichtigt werden, die wegen des hyperbolischen Verlaufs von σ_w relativ viel zur Bremsstrahlung beitragen.

Experimentell wurde die Abhängigkeit der weißen Strahlung von der Massenbelegung bestimmt, indem auf Standardschnitten, die bei der Präparation umgeschlagen wurden, die weiße Strahlung als Funktion der Zahl der Lagen gemessen wurde. Es ergibt sich ein Zusammenhang, der in Abb. 32 schematisch dargestellt ist und mit dem sich die Konzentrationen pro Feuchtgewicht bestimmen lassen. Trägt man auf der Ordinate die weiße Strahlung n_{ws} auf, die der interne Standard eines Schnittes emittiert, so kann man für diesen Schnitt - wie in Abb. 32 gezeigt - eine Eichgerade für den Massenanteil konstruieren. Der

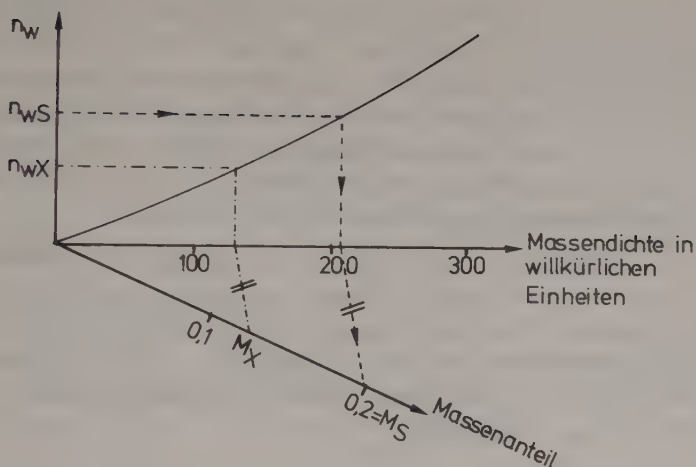


Abb. 32: Die Bestimmung der Konzentration pro Feuchtgewicht mit Hilfe eines internen Standards (Einzelheiten s. Text).

Massenanteil M_S des Standards muß bekannt sein, er ist in Abb. 32 z.B. 0,2, was einer 20%igen Albuminlösung entspricht. Für einen Meßpunkt mit der weißen Strahlung n_{wx} wird die analoge Konstruktion durchgeführt. Auf der mit dem internen Standard geeichten Gerade kann dann der Masseanteil M_x dieser Meßstelle abgelesen werden. Die Konzentration eines Elements i an der Meßstelle x ergibt sich dann zu

$$k_{ix} = c_{ix} M_x \left[\frac{\text{Mol}}{\text{g Feuchtgewicht}} \right]$$

b) Quantifizierung an massiven tiefgefrorenen Präparaten

Die Quantifizierung am massiven Präparat ist wegen der Vielfalt der auftretenden physikalischen Phänomene sehr unüberschaubar. Die aus der Festkörperphysik bekannten, meist ziemlich komplizierten Prozeduren müssen nicht verwendet werden, weil relativ einfach Eichlösungen hergestellt werden können, deren Zusammensetzung dem aktuellen Präparat entspricht.

Da die Konzentrationen des zu analysierenden Elements sehr klein sind, ist zu erwarten, daß die Konzentration eines Elements proportional dem Signal zu Untergrundverhältnis ist. Diese Annahme wird durch eigene Messungen (8) und Ergebnisse von Gullasch (persönliche Mitteilung) bestätigt.

III) Literatur zur Methode

Die einzelnen Komponenten der für die gefriergetrockneten Kyroschnitte verwendeten Methode sind die Präparationen, die Meßtechnik und die Quantifizierung. Die Probleme, die diese Komponenten stellen, waren in den vergangenen Jahren Gegenstand einiger Untersuchungen. Diese sollen im Zusammenhang zur eigenen Arbeit dargestellt werden.

1. Schockfrieren

Moor und Riehle (13, 14) benutzten eine Apparatur, in der das Gewebe in flüssigem Stickstoff bei sehr großen Drucken ($\sim 2 \cdot 10^3$ atm) gefroren wird. Durch den hohen Druck wird ein guter Wärmeübergang erzielt, der die Vitrifikation oberflächlicher Schichten erlaubt. Dabei wird gegenüber dem hier verwendeten Verfahren (s. Kapitel 1) ein um ca. 10° C größerer Temperaturgradient zwischen Kühlmedium und Gewebe erzielt, was aber für unsere Zwecke den erheblich höheren technischen Aufwand nicht zu rechtfertigen scheint.

Appleton (15) friert kleine Gewebsstücke ($\sim 1 \text{ mm}^3$) auf einem Metallhalter kleiner Masse durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff oder in Isopentan ein. Er gibt an, daß er auf Kryoschnitten artefaktfreie Areale bis zu 20μ Durchmesser erhält.

Christensen (16) drückt "schnell aber sachte" Gewebstückchen ($\sim 1 - 2 \text{ mm}^3$), die auf einem Halter montiert sind, gegen die polierte Fläche eines Kupferblocks, den er mit flüssigem Stickstoff kühlt, und taucht nach wenigen Sekunden Präparat und Kupferblock in den flüssigen Stickstoff. Er vitrifiziert auf diese Weise eine ober-

flächliche Schicht von ca. 30 μ Dicke. Ungünstig scheint bei diesem Verfahren zu sein, daß der Probenhalter in der ersten Phase des Einfrierens auf dem Umweg über das Präparat gekühlt wird, was dessen Abkühlgeschwindigkeit reduziert. Die Verwendung eines Kühlblocks aus Metall hat gegenüber einer Kühlflüssigkeit den Vorteil, daß das Metall eine höhere Wärmeleitfähigkeit und eine höhere spezifische Wärme hat. Werden Supraleiter bei hinreichend tiefen Temperaturen verwendet, so lassen sich diese Eigenschaften extrem ausnutzen. Es ist allerdings nicht sicher, wie gut im Endeffekt der Wärmeübergang von Kühlmetall zu Präparat ist, weil die zuerst gefrorene Oberfläche durchaus rauh sein kann und u.U. mit dem Kühlblock keinen guten flächenhaften Kontakt bildet. Einen Hinweis darauf gibt Christensens Bemerkung, daß Versuche mit flüssigem Helium bei -268°C nicht den Erfolg gebracht hätten, der diesen Aufwand rechtfertigen würde.

Der Nachteil kleinerer spezifischer Wärme und Wärmeleitfähigkeit einer Kühlflüssigkeit kann dadurch reduziert werden, daß das Präparat rasch über einen längeren Weg durch die Flüssigkeit hindurch geführt wird, so daß dauernd frisches Kühlmedium das Gewebe umspült.

2. Herstellung und Verwendung gefriergetrockneter Kryoschnitte

- a) Zeitz und Andersen (17) analysierten Zn in 7 μ dicken, bei -15°C hergestellten Schnitten der Rattenprostate mit einer konventionellen Mikrosonde.

Läuchli (18) analysierte in bei -12°C hergestellten, 20 μ dicken Schnitten des Fruchtstiels von *pisum sativum* Calcium- und Strontiumablagerungen.

Rosenstiel et al. (19) analysierten die intrazellulären Elektrolytkonzentrationen in 5 - 7 μ dicken, bei - 25° C hergestellten Nierenschnitten bei 35 KeV mit 60 mA.

Tousimis (20) nahm bei 12 KeV und 20 mA Elementverteilungsbilder für Na, S, P, Cl, K und Ca von gefriergetrockneten, relativ dicken Kryoschnitten der Bauchhaut von *rana pipiens* auf.

Diese Untersuchungen sind dadurch charakterisiert, daß bei hohen Temperaturen relativ dicke Schnitte hergestellt wurden, die dann in konventionellen Mikrosonden mit Strahlströmen von 20 - 60 nA analysiert wurden.

- b) Stumpf und Roth (21) beschreiben eine Gefrierschneidetechnik, mit der bei Temperaturen von - 60° C Schnitte von 1/2 bis 1 μ Dicke hergestellt werden können. Als Kriterium dafür, daß diffusible Substanzen in gefrorenem Gewebe an ihrem ursprünglichen Ort bleiben, geben sie an, daß das Präparat kälter als - 60° C gehalten werden muß.

Appleton (2), Christensen (3) und Hodson und Marshall (4) berichten über Techniken zur Herstellung von Ultradünnschnitten bei Temperaturen tiefer als - 70° C. Das in diesem Zusammenhang Wesentliche an diesen Arbeiten ist, daß gezeigt wurde, daß dünne und ultradünne Schnitte mit guter Erhaltung der Morphologie trocken bei Temperaturen hergestellt werden können, bei denen noch keine Rekristallisation auftritt (22).

3. Kombination eines Rastermikroskops mit nahem energiedispersivem Röntgenspektrometer

Die Verwendung eines Rastermikroskops mit Bilderzeugung durch transmittierte Elektronen wird von Hall (7) als günstig für die histologische Korrelation bei der Analyse von $1\ \mu$ dicken Schnitten diskutiert. In derselben Arbeit wird erwähnt, daß mit einem nahe ans Präparat gebrachten, energiedispersiven System die Effizienz erheblich vergrößert werden kann.

4. Quantifizierung

Marshall und Hall (23) gaben ein Verfahren zur Quantifizierung an dünnen Filmen an, das sich für dünne Schnitte gut eignet.

Hall und Höhling (24) weisen darauf hin, daß die weiße Strahlung ein Maß für die Trockenmasse der analysierten Stelle ist, mit dessen Hilfe man die Konzentrationen pro Volumen bestimmen kann. Durch den Effekt, daß die Schalenelektronen die Kernladung abschirmen, wird die Behandlung der weißen Strahlung in Halls Methode (7) einfacher. Es wird nämlich für Präparate, für deren Elemente $F(Z)$ (s. Kapitel 5a) als proportional Z (s. Abb. 28) angesetzt werden kann, die weiße Strahlung unabhängig von der Elementzusammensetzung ein Maß für die Massenbelegung an der analysierten Stelle.

IV) Ergebnisse an biologischen Geweben

Messungen an biologischem Gewebe wurden bisher an Epithelien (Niere (18), Froschhaut (25, 26, 27)) durchgeführt, die einen transepithelialen Transport aufweisen.

Niere

Die Möglichkeit, direkt in der Zelle zu messen, bietet besonders bei der Niere einen Vorteil gegenüber den chemischen Analysemethoden, bei denen der Extrazellulärraum mit einem Marker bestimmt werden muß. Dieser wird während der Passage durch den Tubulus konzentriert, so daß in den verschiedenen extrazellulären Kompartimenten der Marker in verschiedenen Konzentrationen vorliegt. Dadurch wird eine Abschätzung des extrazellulären Raumes sehr erschwert.

Abb. 33 a zeigt ein Spektrum einer proximalen Tubuluszelle, gemessen an einem gefriergetrockneten Kryoschnitt. Die Natriumkonzentration liegt bei 60 meq/kg, die Kaliumkonzentration bei 85 meq/kg. Da das analysierte Volumen hier auch Teile des extrazellulären basalen Labyrinths enthält, welches gegenüber der Zelle relativ viel Natrium und wenig Kalium aufweist, dürfte der Wert für Natrium gegenüber dem wirklichen intrazellulären Natrium etwas zu hoch, der für Kalium etwas zu niedrig sein.

Abb. 33 b zeigt ein typisches Spektrum des Kerns einer proximalen Tubuluszelle. Die Natriumkonzentration beträgt etwa 55, die Kaliumkonzentration etwa 125 meq/kg.

Abb. 33 c zeigt ein Spektrum des Intrazellulärraums des distalen Konvoluts: $[Na] = 15$; $[K] = 140$ meq/kg.

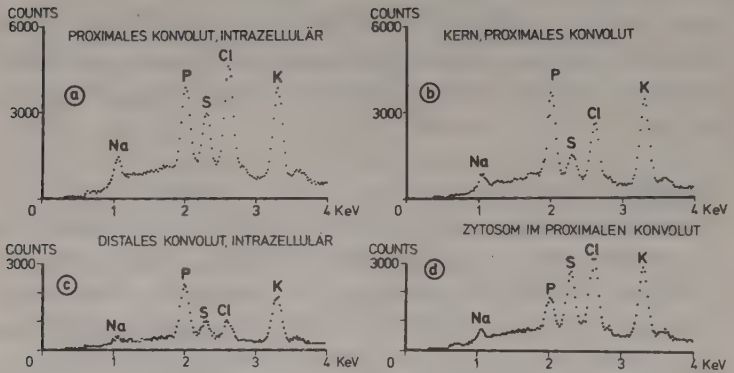


Abb. 33: Vielkanalspektren gefriergetrockneter Kryoschnitte aus der Rinde der Rattenniere:

- a) Intrazellulärraum einer proximalen Tubuluszelle
- b) Kern einer proximalen Tubuluszelle
- c) Intrazellulärraum einer distalen Tubuluszelle
- d) Zytosom in einer proximalen Tubuluszelle.

Abb. 33 d zeigt das Spektrum eines Zytosoms in einer proximalen Tubuluszelle: $[Na] = 85$; $[K] = 105$ meq/kg.

Froschhaut

Die Froschhaut transportiert aktiv Natrium von der Außen- (Epithel-) zur Innenseite (Corium).

Abb. 34 zeigt ein Spektrum, das bei Messung im Kern einer Froschhautepithelzelle erhalten wurde und eines vom Zytoplasma derselben Zelle. Vor der Präparation

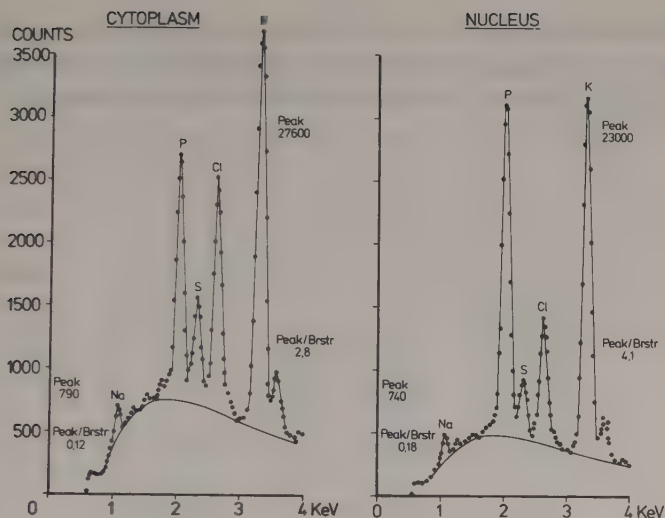


Abb. 34: Vielkanalspektren vom Kern und Zytoplasma derselben Froschhautepithelzelle.

wurde die Haut unter Kontrollbedingungen in einer Ussing-Kammer inkubiert (Frosch-Ringer-Lösung auf beiden Seiten). Die Konzentrationen für Natrium und Kalium sind praktisch gleich:

$$[\text{Na}] = 30, [\text{K}] = 115 \text{ meq/kg.}$$

In einer Reihe von Versuchen wurde der transepitheliale Natriumtransport der Froschhaut vermindert und anschließend die Elektrolytverteilung über das Epithel analysiert. Der aktive Transportschritt wurde an der Innenseite der Haut durch Strophanthin blockiert oder der

passive Eintritt von Natrium in die Haut durch das Diuretikum Amilorid oder durch Herabsetzen der Natriumkonzentration in der äußeren Badelösung gehemmt.

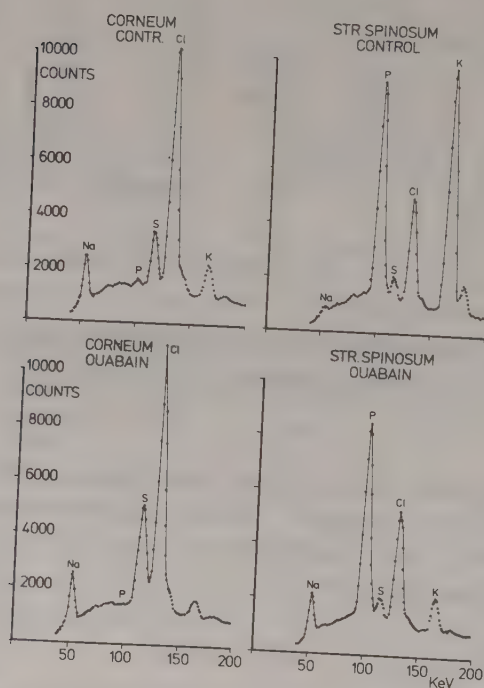


Abb. 35: Im Stratum corneum und Stratum spinosum des Froschhautepithels gemessene Spektren.
Oberes Paar: Kontrolle
Unteres Paar: Nach Anwendung von 10^{-4} mol/l Strophanthin-g (Ouabain).

Abb. 35 zeigt den Effekt von Strophantin auf das Stratum corneum und auf das Stratum spinosum. Das Spektrum des Stratum corneum zeigt einen Extrazellulärraum mit viel Natrium und wenig Kalium. Diese Verteilung wird durch das Strophantin nicht beeinflusst. Dagegen zeigt das Stratum spinosum in der Kontrolle eine typische intrazelluläre Elektrolytverteilung, die durch Gabe von Strophantin beeinflusst wird: Die Natriumlinie ist unter Kontrollbedingungen niedrig und wird nach Strophantin größer, während die Kaliumlinie das umgekehrte Verhalten zeigt. Dieser Effekt des Strophantins wurde in allen Zellen des Epithels beobachtet. Die Quantifizierung ergab, daß intrazellulär die Natriumkonzentration nach Strophantin von 25 auf 120 meq/kg steigt, während die Kaliumkonzentration von 135 auf 45 fällt.

Abb. 36 zeigt Ausschnitte von Spektren im Bereich der Natriumlinie, wie sie in den verschiedenen Epithelschichten der Froschhaut unter Kontrollbedingungen und nach Hemmung des transepithelialen Natriumtransportes durch Amilorid gemessen wurden. Die Spektren stammen von zwei verschiedenen Schnitten derselben Haut. Im Stratum corneum wird die Natriumlinie durch Amilorid nicht verändert.

Unter Kontrollbedingungen konnte in der ersten funktionellen Zellschicht, dem Stratum granulosum, und im Stratum germinativum Natrium in der Größenordnung von 20 - 30 meq/kg gefunden werden. In den beiden Zellagen des Stratum spinosum ist Natrium nicht erfaßbar. Nach Einwirkung von Amilorid ist Natrium im Stratum granulosum nicht mehr nachweisbar, während die Natriumkonzentration im Stratum germinativum unbeeinflusst bleibt.

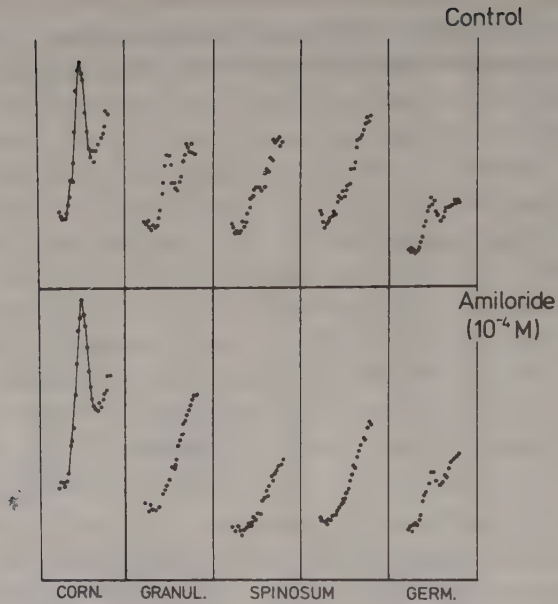


Abb. 36: Ausschnitt aus Spektren um die Natriumlinie für die verschiedenen Epithelzellagen der Froschhaut.

Obere Reihe: Kontrolle

Untere Reihe: Nach Anwendung von 10^{-4} mol/l Amilorid.

Nach der allgemein akzeptierten Vorstellung blockiert Amilorid an der Epithelseite den Eintritt des Natriums in die Froschhaut und hemmt so den Natriumfluß von der Epithel- zur Coriumseite.

Ähnliche Bedingungen für den Natriumtransport wie unter Amilorid lassen sich durch Herabsetzung der Natriumkonzentration in der epithelialen Badelösung schaffen. Abb. 37 zeigt Spektrenabschnitte für Natrium unter Kontrollbedingungen und nach Inkubation mit natriumfreier Cholin-Ringerlösung auf der Epithelseite und normaler

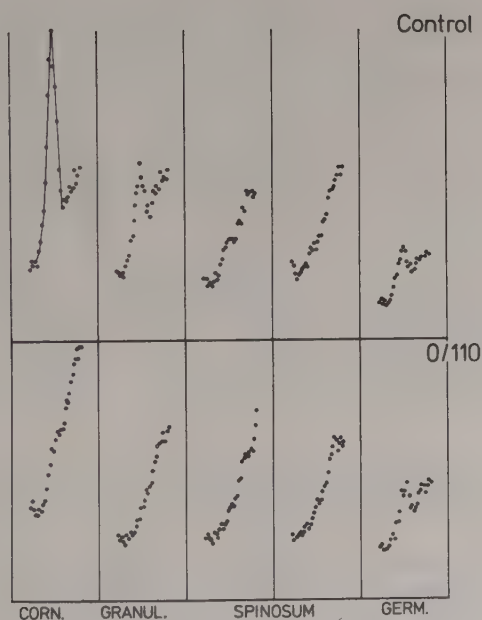


Abb. 37: Ausschnitte aus Spektren um die Natriumlinie für die verschiedenen Epithelzellagen der Froschhaut.

Obere Reihe: Kontrolle

Untere Reihe: Nach Austausch der äußeren Badelösung durch natriumfreie Cholin-Ringerlösung (0/110).

Frosch-Ringerlösung auf der Coriumseite. Nach Inkubation mit natriumfreier Lösung auf der Epithelseite setzt sich das Stratum corneum ins Gleichgewicht mit der Badelösung und Natrium ist praktisch nicht mehr nachweisbar. Wie unter Amilorid ist im Stratum granulosum die Natriumkonzentration herabgesetzt, während sie im Stratum germinativum unverändert bleibt. Die Abnahme des Natriumtransportes geht auch hier, wie unter Amilorid, mit einer Verminderung der Natriumkonzentration im Stratum granulosum einher. Sollte das Natrium auf seinem Weg durch die Haut ein zelluläres Transportkompartiment passieren, so könnte die Einwirkung von Amilorid oder die Herabsetzung der Natriumkonzentration in der äußeren Badelösung eine Verminderung der Natriumkonzentration in diesem Kompartiment hervorrufen. Da sowohl durch Amilorid als auch durch Verminderung der Natriumkonzentration nur im Stratum granulosum die Natriumkonzentration vermindert wird, muß man annehmen, daß das Natrium des Stratum granulosum zum Transportpool gehört.

V) Literaturverzeichnis

1. Castaing, R.:
Thesis, Univ. Paris (1951)
2. Appleton, T.C.:
The possibilities of locating soluble labeled compounds by electron microscope autoradiography.
In: Autoradiography of Diffusible Substances, p. 301,
Ed. Roth and Stumpf, Academic Press (1969)
3. Christensen, A.K.:
A way to prepare frozen thin sections of fresh tissue for electron microscopy.
In: Autoradiography of Diffusible Substances, p. 349,
Ed. Roth and Stumpf, Academic Press (1969)
4. Hodson, S., und J. Marshall:
A device for cutting ultrathin, unfixed frozen sections for electron microscopy.
J.Physiol. 201, 63 (1969)
5. Jackson, J.D.:
Classical Electrodynamics.
John Wiley and Sons (1962)
6. Reimer, L.:
Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden.
Springer-Verlag (1967)
7. Hall, T.A.:
The microprobe assay of chemical elements. In: Physical Techniques in Biochemical Research.
Academic Press 1 A, 157 (1971)
8. Gehring, K., A. Dörge, P. Wunderlich und K. Thureau:
Über die Anwendung der Elektronenstrahlmikroanalyse an gefriergetrockneten Kryoschnitten und an tiefgefrorenem, wasserhaltigem Gewebe von Rattennieren.
In: Beiträge zur elektronenmikroskopischen Direktabbildung von Oberflächen, Bd. 5, S. 937 (1973),
Verlag R.A. Remy, Münster
9. Cosslett, V.E., und R.N. Thomas:
Penetration and energy loss of electrons in solid targets.
In: The electron microprobe, p. 248,
Ed. T.D. McKinley, K.F.J. Heinrich and D.B. Wittry,
Wiley (1966)

10. Gerthsen, Ch.:
Physik, 5. Auflage, Springer-Verlag (1958)
11. Bethe, H.A.:
Ann.Phys., Lpz. 5, 325 (1930)
12. Hehenkamp, Th., und J. Böcker:
Mikrochim.Acta (Wien), Suppl. V (1973)
13. Moor, H., und M. Hoechli:
The influence of high pressure freezing on living cells.
In: Proceedings 7th International Congress Electron Microscopy, Grenoble, 1, 445 (1970)
14. Riehle, U.:
Über die Vitrifizierung verdünnter wässriger Lösungen.
Dissertation ETH Zürich, Diss.Nr. 4271 (1968)
15. Appleton, T.C.:
A cryostat approach to ultrathin dry frozen sections for electron microscopy; a morphological and X-ray analytical study.
Journal of Microscopy (in press)
16. Christensen, A.K.:
Frozen thin sections of fresh tissue for electron microscopy, with a description of pancreas and liver.
J.Cell Biol. 51, 772 (1971)
17. Zeitz, L., und C.A. Andersen:
X-ray microprobe analysis for zinc in the rat prostate.
In: X-Ray Optics and Microanalysis, p. 691,
Ed. R. Castaing, P. Deschamps and J. Philibert
Hermann, Paris (1966)
18. Läuchli, A.:
Nachweis von Calcium-Strontiumablagerungen im Fruchtstiel von Pisum sativum mit der Röntgen-Mikrosonde.
Planta 73, 221 (1967)
19. Rosenstiel, A.P. van, W. Kriz, H.J. Höhling und J. Schnermann:
Messungen von Elektrolyten in Nierenschnitten mit der Mikrosonde.
Mikrochim.Acta (Wien) 697 (1971/5)

20. Tousimis, A.J.:
Electrolyte localization in biological tissues by
electron probe analysis.
Microscopie electronique 1, 487 (1970)
21. Stumpf, W.E., und L.J. Roth:
Frozen sectioning below - 60° C with a refrigerated
microtome.
Cryobiology 1, 227 (1965)
22. Meryman, H.T.:
In: Cryobiology,
Academic Press (1966)
23. Marshall, D.J., und T.A. Hall:
Electron probe X-ray microanalysis of thin films.
J.Phys.D. 1, 1651 (1968)
24. Hall, T.A., und H.J. Höhling:
The application of microprobe analysis to biology.
In: Vth International Congress on X-Ray Optics and
Microanalysis,
Ed. G. Möllenstedt and K.H. Gaukler, Springer-Ver-
lag (1969)
25. Gehring, K., A. Dörge, W. Nagel und K. Thureau:
The use of the scanning electron microscope in
connection with a solid state detector for analysis
and localization of electrolytes in biological
tissue.
In: Modern Techniques in Physiological Sciences,
p. 353,
Ed. J.R. Gross, R. Kaufmann and E. Wetterer,
Academic Press (1973)
26. Gehring, K., A. Dörge, W. Nagel, B. von Schacky,
G. Hausmann und K. Thureau:
Electron probe analysis of electrolytes in freeze-
dried cryosections of the frog skin.
In: Thin-section Microanalysis, p. 141,
Ed. J.C. Russ and B.C. Panessa, published by EDAX
Laboratories, 4509 Creedmoor Road, Raleigh, North
Carolina (1972)
27. Dörge, A.:
Elektronenstrahlmikroanalyse zur Charakterisierung
des transepithelialen Na-Transportes in der Froschhaut.
Habilitationsschrift Univ. München (1974)

Es ist mir ein ganz besonderes Anliegen, Herrn Professor Dr. Thureau für das so außergewöhnliche Interesse zu danken, das er diesem Projekt entgegenbrachte.

Herrn Dr. A. Dörge danke ich für gewissenhafte Zusammenarbeit.

Für Hilfestellungen und produktive Diskussion danke ich

Herrn Dr. Raith und Herrn Ing. Neumann, Fa. Cambridge
Herrn Dr. Russ, Fa. EDAX
Herrn Dr. Hall, University of Cambridge.

Den Mechanikern der Werkstatt des Physiologischen Instituts unter Leitung von Herrn Oberwerkmeister Klotz danke ich für viele verständnisvoll und präzise durchgeführte Sonderanfertigungen.

Lebenslauf

Am 10. Februar 1940 wurde ich in Stuttgart geboren. Die Schulzeit beendete ich im Sommer 1959 am Humanistischen Gymnasium in Erlangen. Nach 18 Monaten Wehrdienst begann ich das Studium der Physik in München. Im Herbst 1966 bestand ich das Diplom an der Technischen Hochschule in München und promovierte dort im Frühjahr 1969 über ein Thema aus der theoretischen Physik. Im Frühjahr 1970 bestand ich das Physikum in Humanmedizin an der Universität München und im Frühjahr 1973 das Staatsexamen. Seit dem Sommer 1970 arbeite ich am Physiologischen Institut der Universität München an der Elektronenstrahlmikroanalyse von diffusiblen Substanzen, in erster Linie von Elektrolyten, in biologischem Weichgewebe.

Von April 1974 bis Juli 1974 war ich als Medizinalassistent am Krankenhaus Seefeld/Oberbayern tätig. Ab September 1974 werde ich im Kreiskrankenhaus Waldshut in der Inneren Abteilung als Medizinalassistent arbeiten.

